

LUÍSA MOTA DA SILVA

**MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS NO EFEITO
GASTROPROTETOR DO EXTRATO ETANÓLICO *de Arctium lappa*
L. EM ÚLCERAS GÁSTRICAS CRÔNICAS INDUZIDAS POR ÁCIDO
ACÉTICO EM RATOS.**

CURITIBA

2010

LUÍSA MOTA DA SILVA

**MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS NO EFEITO
GASTROPROTETOR DO EXTRATO ETANÓLICO *de Arctium lappa*
L. EM ÚLCERAS GÁSTRICAS CRÔNICAS INDUZIDAS POR ÁCIDO
ACÉTICO EM RATOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Consuelo Andrade Marques.

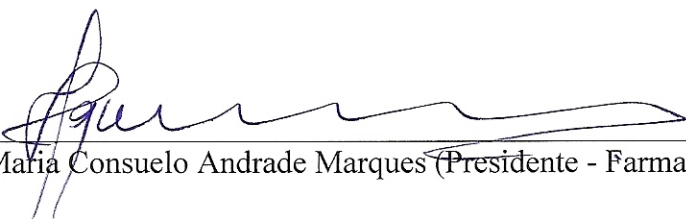
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Eunice André


CURITIBA

2010


ATA DO JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ao vigésimo sexto do mês de março do ano de dois mil e dez, às quatorze horas, no Anfiteatro nº 08 do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado de autoria da pós-graduanda em Farmacologia **LUISA MOTA DA SILVA** intitulada: "MECANISMOS DE AÇÃO ENVILVIDOS NO EFEITO GASTROPROTETOR DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Arctium lappa* L. EM ÚLCERAS GÁSTRICAS CRÔNICAS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO EM RATOS", sob orientação da Prof^a. Dr^a. Maria Consuelo Andrade Marques e composta pelos professores: Prof^a. Dr^a. Maria Consuelo Andrade Marques (Presidente - Farmacologia - UFPR); Prof^a. Dr^a. Rosely Godinho (UNIFESP); Prof^a. Dr^a. Joice Maria da Cunha (UFPR). A Banca Examinadora iniciou os trabalhos. A candidata teve quarenta e cinco minutos para expor oralmente seu trabalho, sendo em seguida argüido durante quinze minutos por cada um dos membros da Banca, e tendo trinta minutos para responder a cada uma das argüições. No final a Comissão Examinadora emitiu o seguinte parecer: APROVADA. De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi aprovada. Para a publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pela sua orientadora. Nada mais havendo a tratar, a Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a presente ata, que será assinada pela Presidente e pelos demais Membros da Banca Examinadora, em Curitiba, 26 de março de 2010.


Prof^a. Dr^a. Maria Consuelo Andrade Marques (Presidente - Farmacologia - UFPR)


Prof^a. Dr^a. Rosely Godinho (UNIFESP)


Prof^a. Dr^a. Joice Maria da Cunha (UFPR)


Prof. Dr. ANDERSON JOEL MARTINO DE ANDRADE (UFPR)

Centro Politécnico – Caixa Postal 19031 – CEP: 81531-990 – Curitiba/PR
Telefones: (41) 3361-1693 – Fax (41) 3266-2042 – pgfarmacologia@ufpr.br
<http://farmacologia.bio.ufpr.br/posgraduacao>

PARECER


A Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado “MECANISMOS DE AÇÃO ENVILVIDOS NO EFEITO GASTROPROTETOR DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Arctium lappa* L. EM ÚLCERAS GÁSTRICAS CRÔNICAS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO EM RATOS”, de autoria da pós-graduanda **LUISA MOTA DA SILVA**, sob orientação da Prof^ª. Dr^ª. Maria Consuelo Andrade Marques e composta pelos professores: Prof^ª. Dr^ª. Maria Consuelo Andrade Marques (Presidente - Farmacologia - UFPR); Prof^ª. Dr^ª. Rosely Godinho (UNIFESP); Prof^ª. Dr^ª. Joice Maria da Cunha (UFPR). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi APROVADA. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pela sua orientadora. Em Curitiba, 26 de março de 2010.



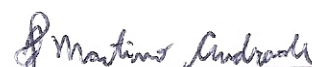
Prof^ª. Dr^ª. Maria Consuelo Andrade Marques (Presidente - Farmacologia - UFPR)



Prof^ª. Dr^ª. Rosely Godinho (UNIFESP)



Prof^ª. Dr^ª. Joice Maria da Cunha (UFPR)



Prof. Dr. ANDERSON BOEL MARTINO DE ANDRADE (UFPR)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

Aos meus pais, Luzinete e Daniel, pelo incentivo, apoio e dedicação, os quais foram fundamentais para que esta conquista se realizasse.

Aos meus irmãos: Bruno, Felype e Levy, por iluminarem minha vida.

Ao amigo Rafael pela cumplicidade, cuidado e paciência, à amiga Alexandra pelo carinho e amizade conquistada.

À orientadora, professora Dra Maria Consuelo Andrade Marques, pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Gastro.

Às co-orientadoras, professoras Dra Eunice André e Dra Maria Fernanda Werner por todo empenho, sabedoria, compreensão e, acima de tudo, exigência.

Ao professor Dr Moacir Geraldo Pizolatti, pelo apoio fitoquímico.

À equipe do Lab 81 A, Alexandra, Ana, Fran, Ligia e Isa os quais, junto com as participaram diretamente neste trabalho e, além disso, proporcionaram momentos e gargalhadas memoráveis.

À colaboração e paciência do amigo Daniel.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa dissertação de Mestrado.

Por fim, agradeço a CAPES e a Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

"Ainda que eu falasse a língua dos homens, que eu
falasse a língua dos anjos, tivesse o dom da profecia e
conhecesse todos os mistérios da ciência sem amor
eu nada seria..."
Coríntios 13

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE QUADROS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS SÍMBOLOS.....	x
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Revisão bibliográfica.....	3
1.1.1 <i>Arctium lappa</i> L.....	3
1.1.2 Anatomia e fisiologia gástrica.....	7
1.1.2.1 <i>Mecanismos estimulantes da secreção gástrica</i>	9
1.1.2.2 <i>Mecanismos inibidores da secreção gástrica</i>	12
1.1.3 Fatores de agressão e proteção da mucosa gástrica.....	12
1.1.4 Úlcera péptica.....	19
2. OBJETIVO GERAL.....	24
2.1 Objetivos específicos.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Material botânico.....	26
3.1.1 Origem.....	26
3.1.2 Preparação do extrato.....	26
3.2 Animais.....	27
3.3 Lesões gástricas induzidas por ácido acético.....	27
3.4 Análise histológica.....	29

3.5 Avaliações dos níveis de expressão da proteína PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) por método imunohistoquímico.....	29
3.6 Determinação do muco gástrico.....	31
3.7 Determinação da permeabilidade microvascular	31
3.8 Estudo <i>in vitro</i> da atividade seqüestradora de radicais livres (DPPH)	32
3.9 Métodos bioquímicos.....	32
3.9.1 Quantificação dos níveis enzimáticos de mieloperoxidase (MPO).....	33
3.9.2 Determinação “ <i>in vitro</i> ” da atividade enzimática de mieloperoxidase (MPO)	34
3.9.3 Determinação da atividade enzimática da N-acetilglucosamidase (NAG)	35
3.9.4 Quantificação de grupos sulfidrílicos não protéicos (GSH) na região glandular gástrica.	36
3.9.5 Quantificação da atividade enzimática da catalase (CAT) na região glandular gástrica	36
3.9.6 Quantificação dos níveis de superóxido dismutase (SOD) na região Glandular Gástrica	37
3.9.7 Determinação intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs)	38
3.9.8 Determinação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH).....	39
3.10 Avaliação da atividade anti-secretora ácida: Ligadura de Píloro.....	39
3.11 Estudo do mecanismo de ação anti-secretor ácido: avaliação da atividade anti-secretora ácida estimulada por Pentagastrina, Betanecol e Histamina.....	40
3.12 Estômago isolado de rato.....	41
3.13 Análise estatística.....	42

4. RESULTADOS.....	43
4.1 Avaliação da atividade cicatrizante do extrato de <i>Arctium lappa</i> L. em úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético.....	43
4.2 Efeito do extrato de <i>Arctium lappa</i> na atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglucosaminidase (NAG) nas úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético.....	49
4.3 Efeitos do extrato <i>Arctium lappa</i> nos níveis intracelulares de radicais livres nas úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético.....	51
4.4 Efeitos do extrato de <i>Arctium lappa</i> no sistema antioxidante enzimático (SOD e CAT) e nos níveis de GSH e LOOH nas úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético.....	52
4.5 Efeito anti-secretor ácido do extrato etanólico de <i>Arctium lappa</i> L. em ratos.....	53
4.6. Efeito do extrato no relaxamento induzido pela histamina no estômago isolado de rato.....	57
4.7. Efeito do extrato na contração induzida pela acetilcolina no estômago isolado de rato de rato.....	58
5. DISCUSSÃO.....	59
6. REFERÊNCIAS.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Arctium lappa</i> L.....	4
Figura 2: Anatomia do estômago.....	8
Figura 3: metodologia de indução de úlcera por ácido acético.....	28
Figura 4: Efeito do extrato etanólico da Bardana nas úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético.....	43
Figura 5: Análise macroscópica (painéis A, B e C) e microscópica (painéis D, E e F) das úlceras crônicas gástricas induzidas por ácido acético em ratos.....	45
Figura 6: Efeito do EET (10 mg/kg, v.o.) na proliferação celular após a indução de úlceras gástricas crônicas	47
Figura 7: Efeito do EET (10 mg/kg, v.o.) na permeabilidade microvascular após a indução de úlceras gástricas crônicas	48
Figura 8: Efeito do EET (10 mg/kg, v.o.) sobre a atividade da MPO e NAG <i>Ex vivo</i> (painel A e C) e na atividade da MPO <i>in vitro</i> (painel B).....	50
Figura 9: Efeitos do extrato etanólico da Bardana (10 mg/kg,v.o.) nos níveis da atividade do radical DPPH (Painel A) e no conteúdo de radicais livres intracelulares (Painel B).....	51
Figura 10: Efeito do extrato sobre o volume da secreção gástrica (painel A) e sobre a acidez da secreção gástrica (painel B) em ratas piloro-ligados.....	54

Figura 11: Efeito do extrato sobre a atividade secretagoga do betanecol, histamina e pentagastrina no volume (painel A, C, E, respectivamente) e na acidez da secreção gástrica (painel B, D, F, respectivamente).....56

Figura 12: Efeito do EET (0,1; 0,3 e 1 mg/ml) sobre o relaxamento causado pela histamina (10 nM a 10 μ M) em segmentos da musculatura lisa circular de estômagos de rato.....57

Figura 13: Efeito do EET (0,1; 0,3 e 1 mg/ml) sobre a contração induzida pela acetilcolina (1nM a 1 mM) em segmentos da musculatura lisa circular de estômagos de rato.....58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito do tratamento oral com extrato (10 mg/kg), Omeprazol (O: 40 mg/kg) e Ácido ascórbico (AA: 250 mg/kg) na atividade das enzimas antioxidantes e nos níveis de GSH e LOOH nas úlceras gástricas induzidas por ácido acético.....	53
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1 – Classificação da <i>Arctium lappa</i> L. no reino vegetal, descrito por COSTA (1991).....	03
---	----

LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

Ach – acetilcolina

AINES – anti-inflamatório não esteroide

AMPc – monofosfato de adenosina cíclico

ANOVA – Análise de variância

ATC – ácido tricloroacético

ATP – trifosfato de adenosina

CAT – catalase

CB1 – receptor canabinoide tipo 1

CCK – colecistocinina

CCl₄ – tetracloreto de carbono

CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CaCO₃ – carbonato de cálcio

Cl⁻ – cloreto

CO₂ – gás carbônico

DCFH-DA – 2',7'-diclorfluoresceína-diacetato

DMSO – dimetil-sulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

DTNB – ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)

ECL – células enterocromafins

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

EET – extrato bruto etanólico das raízes da Bardana (UFSC)

EGTA – ácido bis(2-amino-etil) etilenoglicol-N,N,N',N'-tetracético

EP1 – receptor de prostaglandina subtipo 1

EP2 – receptor de prostaglandina subtipo 2

EP3 – receptor de prostaglandina subtipo 3

Eq – equivalente-grama

FAS – Fundação de ação social

GPx – glutational peroxidase

GR – glutational redutase

GRP – peptídio liberador de gastrina

GSH – glutational reduzida

GSSH – glutational oxidada

GST – glutational-S-transferase

H⁺, K⁺ ATPase – hidrogenio, potássio adenosina trifosfatase

H2 – receptor de histamina subtipo 2

H3 – receptor de histamina subtipo 2

H2O2 – peróxido de hidrogênio

HCl – ácido clorídrico

HCO₂⁻ – íon bicarbonato

H₂CO₃ – Ácido carbônico

HIV – virus da imunodeficiência humana

ICAM – molécula de adesão intercelular

id – via intraduodenal

IL - interleucina

ip – via intraperitoneal

IP3 – inositol 1,4,5 trifosfato

KCl – cloreto de potássio

LPS – lipopolissacarídeo de membrana bacteriana

LOOH – hidroperoxidação lipídica

LTB₄ – leucotrieno do tipo B₄

LTC₄ – leucotrieno do tipo C₄

M – Molar

M₁ – receptor muscarínico subtipo 1

M₃ – receptor muscarínico subtipo 3

Mg(OH)₂ – hidróxido de magnésio

MgSO₄ – sulfato de magnésio

MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno

MPO – mieloperoxidase

NaCl – cloreto de sódio

NaDPH – nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato

NaOH – hidróxido de sódio

NaHCO₃ – bicarbonato de sódio

NaH₂PO₄ – dihidrogeno fosfato de sódio

N₂O₃ – trióxido de nitrogênio

NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase

NOS_i – óxido nítrico sintase induzida

O₂⁻ - ânion superóxido

OH – hidroxila

PACAP – peptídeo ativador de adenilato ciclase pituitária

PAF – fator de agregação plaquetária

pH – potencial hidrogeniônico

PYY – peptídeo YY

PG - prostaglandina

PGE2 – prostaglandina E 2

PGI2 – prostaciclina

ROS – espécies reativas de oxigênio

RL – radicais livres

SNE – sistema nervoso entérico

SOD – superóxido desmutase

TBXA2 – tromboxano do tipo A2

TGF- α – fator de crescimento transformador alfa

TGI – trato gastrointestinal

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

TRIS – tris (hidroximetil) aminometano

UFPR – Universidade Federal do Paraná

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

VIP – polipeptídeo intestinal vasoativo

vo – via oral

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

RESUMO

A *Arctium lappa* L. é uma planta da família Asteraceae (Compositae), conhecida popularmente como bardana. Estudos anteriores realizados no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, demonstraram os efeitos gastroprotetores desta planta na úlcera gástrica induzida por ácido acético em ratos. No entanto, o mecanismo de ação envolvido neste efeito não ficou esclarecido. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o mecanismo pelo qual o extrato etanólico, obtido do pó das raízes da Bardana, promove gastroproteção. A administração oral do extrato etanólico de *Arctium lappa* L., duas vezes ao dia, durante sete dias, reduziu a extensão das lesões gástricas crônicas induzidas por ácido acético. O tratamento com o extrato reduziu significativamente a permeabilidade microvascular e inibiu a atividade da mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglucosaminidase (NAG). Além disso, o extrato também foi capaz de restaurar os níveis da atividade da SOD, de prevenir a diminuição dos níveis de GSH e reduzir os níveis de LOOH, mas não alterou o aumento da atividade da CAT e nem os níveis de muco gástrico nos estômagos ulcerados. *In vitro*, o extrato etanólico, bem como, ácido ascórbico inibiu o radical DPPH e o tratamento crônico dos animais com o extrato ou ácido ascórbico também reduziu a geração intracelular de radicais livres. Entretanto, o ácido ascórbico não foi capaz de reduzir a extensão das lesões gástricas e nem de restaurar os níveis de MPO, NAG, SOD, CAT e LOOH. O extrato etanólico foi capaz de diminuir o volume e a acidez da secreção basal, bem como, aquela estimulada por betanecol e histamina, mas não por pentagastrina. Experimentos com estômago isolado revelaram que o extrato antagonizou os receptores muscarínicos de maneira dependente da concentração, mas não os receptores histaminérgicos da mucosa gástrica. Em conjunto, os resultados obtidos sugerem que o efeito gastroprotetor do extrato etanólico de *Arctium lappa* L. parece envolver a redução da secreção ácida gástrica, possivelmente pela inibição de receptores muscarínicos, promovendo uma melhora no processo inflamatório com restabelecimento do sistema antioxidante. No entanto, estudos adicionais ainda são requeridos para melhor elucidar esse efeito.

Palavras -chaves: *Arctium lappa*, úlcera crônica e gastroproteção,

ABSTRACT

Arctium lappa L. is a member of the Asteraceae (Compositae) family popularly known as "bardana". In previous studies, we have reported a significant gastroprotective effect of this plant in gastric ulcer induced by acetic acid in rats. However, the mechanism by which *Artium lappa* causes this action has not been completely clarified. Thus, the present study sought to investigate the mechanism by which the ethanolic extract obtained from the powder of the roots of Burdock exerts a healing-promoting effect on acetic acid-induced chronic gastric ulcers. We have observed that the oral administration of ethanolic extract of *Arctium lappa* L. twice daily for seven days reduced the extent of chronic gastric lesions induced by acetic acid. The treatment with the extract significantly reduced microvascular permeability and inhibited the myeloperoxidase (MPO) and N-acetylglucosaminidase (NAG) activity. In addition, the extract was able to restore the SOD, but not CAT activity. We have observed that the etanolic extract prevented the decrease of GSH levels and reduced LOOH levels but did not alter the levels of gastric mucus in the ulcerated stomach. The scavenger activity of ethanolic extract "in vitro" was confirmed with the DPPH assay. Furthermore, the chronic treatment of animals with the extract or ascorbic acid also reduced the intracellular generation of free radicals. However, ascorbic acid was able neither to reduce the extent of gastric lesions nor restore the levels of MPO, NAG, SOD, CAT and LOOH. The ethanolic extract reduced the volume and basal acid secretion as well as that stimulated by bethanechol and histamine, but not by pentagastrin. Experiments with isolated stomach showed that the extract antagonized, in a concentration-dependent manner, muscarinic, but not histaminergic receptors on gastric mucosa. Together, these results suggest that the gastroprotective effect of ethanolic extract of *Arctium lappa* L. appears to be involved in the reduction of gastric acid secretion, promoting an improvement in processes inflammatory with restoration of the antioxidant system, possibly by inhibiting muscarinic receptors. However, additional studies are required to clarify this effect.

Keywords: *Arctium lappa*, chronic ulcer and gastroprotection

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais é uma das mais antigas estratégias empregadas para o tratamento das enfermidades. Até o início do século XIX a grande maioria dos medicamentos utilizados pelo homem era composta basicamente por produtos de origem natural (BARROS, 2006).

A natureza oferece uma fonte inesgotável de novas estruturas químicas a serem descobertas e, como consequência, uma grande possibilidade para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças que ainda não apresentam cura ou tratamento adequado, o que justifica o grande interesse da indústria farmacêutica por plantas medicinais. Cerca de um terço dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo foram desenvolvidos a partir de produtos naturais, e foi graças aos produtos naturais que muitos fenômenos complexos envolvendo estruturas biológicas como enzimas, receptores, canais iônicos e outros e foram compreendidos (CALIXTO, 2003).

O Brasil poderia se sobressair no cenário mundial da produção de fitomedicamentos, uma vez que possui a maior biodiversidade do mundo (cerca de 20% do número total de espécies do planeta). Entretanto, o nosso país não se destaca no aproveitamento de seus recursos naturais para a produção de fitoterápicos como poderia. Os principais fatores que justificam este fato é a falta de investimentos em muitos dos segmentos da cadeia produtiva de plantas medicinais que levam a pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos. Além dos grandes financiamentos para a utilização de alta

tecnologia, faltam também parcerias entre universidades, centros de pesquisa e as indústrias (CALIXTO, 2001; CORRÊA JÚNIOR e SCHEFFER, 2004).

Nas últimas décadas, distúrbios gastrointestinais tais como úlceras pépticas, refluxo gastroesofágico, síndrome de Zollinger-Ellison e gastrite, têm assumido altas proporções, tornando-se um importante foco de investigação experimental e clínica. Em função desta grande incidência além da sua gravidade, o estudo de produtos naturais que apresentem ação sobre o TGI assume grande interesse social, terapêutico, botânico, empresarial e acadêmico dentre outros.

A pesquisa com plantas medicinais requer a adoção de critérios adequados em todas as suas etapas, desde a seleção das espécies vegetais a serem utilizadas. Especialmente em países com rica biodiversidade e conhecimentos tradicionais abundantes, como é o caso do Brasil, a escolha com base no conhecimento popular ou etnofarmacológico aumenta a possibilidade da descoberta de novos compostos (HOLETZ et al., 2002).

Dando continuidade ao cumprimento do seu papel, principalmente nos aspecto social e acadêmico, o programa de Pós-Graduação do Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) contribui para o uso seguro de plantas medicinais, através da pesquisa científica com metodologias internacionalmente padronizadas, buscando a validação das plantas medicinais com atividade sobre o trato gastrointestinal (TGI).

Consideramos as informações etnofarmacológicas e os resultados obtidos anteriormente com a *Arctium lappa* L., planta conhecida popularmente como Bardana. Este estudo (apresentado a seguir) se concentrou na avaliação da ação gastroprotetora do extrato etanólico extraído do pó das raízes da Bardana sobre lesões gástricas induzidas experimentalmente em ratos e buscou esclarecer os possíveis mecanismos envolvidos nesse efeito.

1.1. Revisão bibliográfica

1.1.1 *Arctium lappa* L.

A *Arctium lappa* L. é uma planta da família Asteraceae (Compositae), originária da Europa e encontrada em países como Portugal, França e Itália, sendo também muito comum no Japão, Taiwan e China (CUNHA *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2005).

DIVISÃO	Magnoliophyta
CLASSE	Magnoliatae
ORDEM	Asterales
FAMÍLIA	Asteraceae
GÊNERO	Arctium
ESPÉCIE	<i>Arctium lappa</i> L.

Quadro 1.1 – Classificação da *Arctium lappa* L. no reino vegetal, descrito por COSTA (1991).

A *Arctium lappa* L. apresenta várias sinonímias nos vários países onde é encontrada. No Brasil é conhecida como Bardana, orelha de gigante, Bardana-maior; pegamasso ou ervados- tinhosos (CUNHA *et al.*, 2003). No Japão é conhecida como gobo (KARDOSOVA *et al.*, 2003); lampazo é a sua denominação nos países de língua espanhola, bardane na França e burdock

nos países de língua inglesa (CORRÊA, 1984; MORGAN, 1997). A *Arctium lappa* L. é uma planta herbácea e bienal, de fácil cultivo, capaz de se desenvolver em ambientes úmidos e sombreados, podendo alcançar até 1,5 m de altura (FONT QUER, 1988) (Figura 1). Apresenta folhas grandes, com formato oval ou lanceolado (as superiores) e peciolado, podendo alcançar 40 cm de comprimento (CASTRO, 1981; FONT QUER, 1988). As flores são rosadas ou púrpuras, e a floração ocorre no verão (CORRÊA, 1984), sendo que suas flores são formadas após o segundo ano do cultivo (MORGAN, 1997). Os frutos, aquênio oblongo-subtrígono, possuem papilos de pêlos muito caducos. As raízes podem chegar a 1,2 m de profundidade e 1 cm de diâmetro. São carnosas, fusiformes, brancas internamente e pardas externamente (FONT QUER, 1988). Preferencialmente, devem ser coletadas antes da floração (CORRÊA, 1984), pois as raízes maduras apresentam suas propriedades terapêuticas reduzidas com o passar do tempo (MORGAN, 1997).



Figura 1. *Arctium lappa* L.

(Fonte: [http:// www.liecitell.sk/vpravoESP.htm](http://www.liecitell.sk/vpravoESP.htm))

Dentre as outras espécies do gênero *Arctium*, COSTA (1991) e CORRÊA (1984) citam a *Arctium nemorosum*, *Arctium leospermum*, *Arctium tomentosum* e *Arctium minus* Bernhadi, esta última podendo ser encontrada no Brasil. A *Arctium minus* B. é também conhecida como Bardana menor. A diferença entre a Bardana menor e a maior, além do tamanho, é a inflorescência. Na *Arctium minus* B. é em racimo (que a prende em um cacho, onde se inserem as flores), e na *Arctium lappa* L. é em corimbo (as flores estão num mesmo nível na porção superior, apesar de surgirem de alturas diferentes). As indicações populares da Bardana são amplas. É utilizada por suas propriedades diuréticas e antipiréticas (CHEN *et al.*, 2004), desmutagênica (MORITA *et al.*, 1984), digestiva e em doenças dermatológicas, como psoríase (CUNHA *et al.*, 2003). A toxicidade da Bardana não é totalmente conhecida, porém pode potencialmente causar dermatite (RODRIGUEZ *et al.*, 1995; CUNHA *et al.*, 2003). No ano de 2003, SASAKI e colaboradores relataram um caso de anafilaxia como consequência da ingestão de Bardana. O consumo da Bardana também não é recomendado durante a gestação, devido a presença de uma atividade estimulante uterina (CUNHA *et al.*, 2003).

Vários estudos descrevem diversas atividades biológicas de diferentes preparações da Bardana, incluindo ação antibacteriana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (PEREIRA *et al.*, 2005), redução de infecções intracanal dentário em cães (GENTIL *et al.*, 2006), redução de edema de pata induzido por carragenina em ratos (LIN *et al.* 1996; Zhao *et al.*, 2009), atividade hepatoprotetora no modelo de hepatotoxicidade induzida pelo acetaminofeno, pelo tetracloreto de carbono (CCl₄) e pelo etanol (LIN *et al.*, 2000; LIN *et al.*,

2002). Além disso; estudos *in vitro* descreveram que a Bardana exerce uma ação antioxidante e sequestradora de radicais livres através da redução das espécies reativas ao oxigênio (ROS) e dos danos ao DNA celular (LEONARD *et al*, 2006).

É interessante também citarmos que alguns compostos isolados da *Arctium lappa* L. apresentaram atividade antiviral. A arctigenina inibiu a replicação do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (EICH, E. *et al*, 1996; VLIETINCK *et al*, 1998; CHO *et al*, 2004) e a baicalina, principalmente quando associada ao zinco, diminuiu a atividade recombinante da transcriptase reversa e a entrada do HIV nas células hospedeiras, atuando como anti-HIV (WANG *et al*, 2004).

Em 2003, no departamento de Farmacologia da UFPR, SBOLLI constatou que o extrato bruto etanólico obtido das raízes da Bardana e a fração clorofórmica deste extrato promoveram efeitos depressores sobre o sistema nervoso central, ação que parece envolver o sistema gabaérgico. Em 2005 teve início os estudos envolvendo os extratos da Bardana e o trato gastrointestinal. O extrato clorofórmico extraído das raízes desta planta apresentou um importante efeito protetor gástrico, o qual parece ser mediado por propriedades antioxidantes e pela inibição da bomba H^+ , K^+ -ATPase (DOS SANTOS *et al*, 2009).

Com base nestes resultados, o objetivo deste trabalho foi dar continuidade aos estudos iniciados em 2005, prosseguindo a avaliação dos extratos obtidos do pó das raízes da Bardana, especificamente do efeito do extrato etanólico sobre o trato gastrointestinal.

1.1.2 Anatomia e fisiologia gástrica

Anatomicamente o estômago é dividido em três porções: fundo, corpo e antro pilórico, sendo limitado por dois sistemas de esfíncteres: o esfíncter esofágico inferior, na parte superior ou proximal do estômago; e o esfíncter pilórico, na parte inferior ou distal do estômago (HOGBEN *et al.*, 1974) (Figura 2). A superfície da mucosa gástrica é recoberta pelas células epiteliais colunares que secretam muco e um líquido alcalino que protege o epitélio da lesão mecânica e do ácido gástrico.

Funcionalmente, a mucosa gástrica pode ser dividida em três regiões glandulares, constituídas de vários tipos celulares. A porção glandular cardíaca está localizada logo abaixo do esfíncter esofágico inferior e contém primariamente células glandulares secretoras de muco. Por outro lado, a porção glandular oxíntica compreende as células parietais secretoras de ácido clorídrico, abrangendo cerca de 80% do estômago (fundo e corpo), células principais (produtoras de pepsinogênio), células produtoras de somatostatina (células D) e células do tipo enterocromafins (ECL) que liberam histamina. A porção glandular pilórica abrange 20% da área total do estômago (antro), apresenta os mesmos tipos celulares que as glândulas oxínticas, excetuando as células principais e incluem as células G, produtoras de gastrina. (JAIN *et al* 2006).

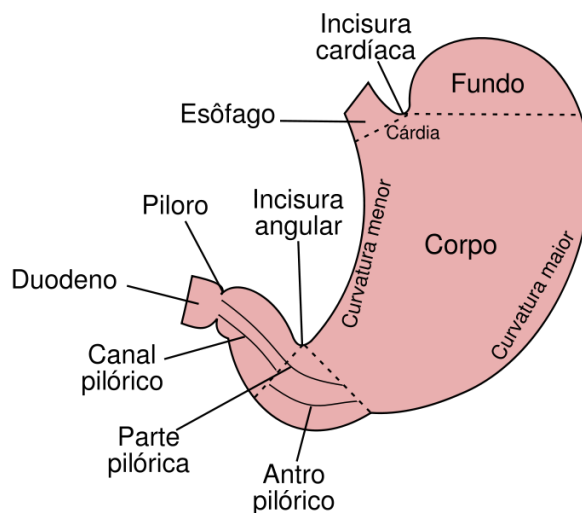


Figura 2. Anatomia do estômago

Fonte: <http://reforcociencias.blogspot.com/2008/04/doenas-relacionadas-ao-estomago.html>

O suco gástrico é uma mistura das secreções das células epiteliais superficiais gástricas e das glândulas gástricas e compreende: HCl, pepsinas, fator intrínseco, muco, bicarbonato, água e sais (BERNE *et al.*, 2004).

A regulação da secreção ácida gástrica é um processo complexo, o qual envolve mecanismos neurais, hormonais, parácrinos e autócrinos em níveis central e periférico os quais convergem para a etapa final da secreção de HCl (SCHUBERT 2005).

Os principais estimulantes parácrinos, hormonais e neuronais da secreção ácida são, respectivamente: histamina, liberada das células ECL; gastrina, liberada das células G e acetilcolina (ACh), liberada dos neurônios pós-ganglionares entéricos. A principal substância inibidora da secreção de HCl é a somatostatina, liberada das células D oxínticas e pilóricas (mecanismo parácrino) (YAO e FORTE 2003).

1.1.2.1 Mecanismos estimulantes da secreção ácida:

Estímulos originados no interior e fora do estômago convergem a neurônios gástricos eferentes, os quais constituem a regulação primária da secreção ácida. Os neurônios eferentes compreendem neurônios colinérgicos e não colinérgicos, responsáveis pela liberação de GRP (peptídeo liberador de gastrina), VIP (peptídeo intestinal vasoativo) e PACAP (peptídeo ativador de adenilato-ciclase pituitária).

Na região do corpo e fundo do estômago, ACh liberada dos neurônios colinérgicos estimula a secreção ácida por ação direta na célula parietal através de receptores muscarínicos do tipo M_3 , bem como indiretamente, pela eliminação do efeito inibitório que a somatostatina exerce tanto nas células parietais como nas células ECL. Os receptores M_3 são acoplados a proteína G e induzem a ativação de fosfolipase C com geração de inositol trifosfato (IP3) e liberação de cálcio intracelular. As células ECL no estômago produzem histamina, que é estocada em vesículas secretoras, sendo liberada após alguns estímulos (MÖSSNER e CACA 2005). A histamina liberada estimula as células parietais diretamente pela ligação em receptores H_2 . Estes receptores são acoplados a proteína G, e quando ativados, estimulam a adenilato ciclase com geração de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC). A histamina também estimula a secreção ácida indiretamente através da sua ligação a receptores H_3 , que inibem a secreção de somatostatina (KAZUMORI *et al*, 2004). A gastrina, PACAP (peptídeo ativador de adenilato ciclase pituitária), VIP, grelina e TGF- α (fator de crescimento transformante alfa) estimulam a secreção de histamina; somatostatina, CGRP, prostaglandinas, peptídeo YY (PYY) e

galanina inibem a secreção. A ACh não tem qualquer efeito direto sobre a secreção histaminérgica (SCHUBERT e PEURA 2008).

A gastrina é o principal estimulante da secreção ácida durante ingestão de alimento. É produzida pelas células G no antro gástrico e, em menor quantidade na região proximal do intestino delgado, cólon e pâncreas (SCHUBERT 2005). Foram caracterizados duas classes de receptores CCK para a gastrina, CCK1 (específicos para colecistocinina) e receptores CCK2 (com grande afinidade a gastrina). A ativação desses receptores promove a liberação de cálcio intracelular (SCHUBERT e PEURA 2008), porém as concentrações intracelulares de AMPc devem estar primeiramente elevadas para que a gastrina possa estimular diretamente a célula parietal. Parece que a principal ação da gastrina sobre as células parietais é de sensibilização para outros secretagogos agindo como "*cross talk*" ou como uma interação sinérgica entre as vias de sinalização. A ACh, GRP, secretina, agonistas β_2/β_3 adrenérgicos, cálcio, estimulam a secreção de gastrina, enquanto que somatostatina, galanina, e adenosina inibem a secreção da mesma. No antro, neurônios colinérgicos estimulam a secreção de gastrina diretamente nas células G e indiretamente pela supressão de somatostatina nas células D. Em concentrações fisiológicas, a gastrina estimula as células parietais indiretamente pelo aumento da secreção de histamina. Além disso, proteínas da dieta ativam neurônios como GRP que estimulam diretamente a secreção de gastrina pelas células G (SCHUBERT e PEURA 2008).

A ação da H^+ , K^+ ATPase, localizada na membrana apical da célula parietal, é bombear H^+ contra um gradiente de concentração, exercendo papel

fundamental na secreção ácida gástrica. Esta enzima consiste de duas subunidades, sendo que a subunidade α realiza as funções catalíticas e de transporte da enzima, enquanto a subunidade β é extremamente glicosilada e protege a enzima da degradação, sendo necessária para o deslocamento da enzima entre o plasma e a membrana.

A célula parietal tem a membrana apical revestindo o lúmen das glândulas gástricas e a membrana basolateral em contato com o fluido intersticial. Os canalículos se estendem desde a membrana apical para dentro da célula. As células contêm também estruturas túbulo-vesiculares com moléculas da H^+ , K^+ ATPase nas paredes (GANOG, 2003). Quando as células parietais são estimuladas, as estruturas túbulo-vesiculares se direcionam a membrana apical e se fusionam com ela, inserindo muitas moléculas de H^+ , K^+ ATPase na membrana. A H^+ , K^+ ATPase promove a secreção do H^+ no lúmen gástrico, trocando-o por K^+ . O Cl^- também é expelido através de seus canais ativado por AMPc. O HCO_3^- , formado pela dissociação do H_2CO_3 , e é expelido por antiporte na membrana basolateral das células parietais que trocam o HCO_3^- por outro ânion, principalmente Cl^- (GANOG, 2003).

A secreção ácida pela célula parietal envolve a elevação dos níveis intracelulares de cálcio e AMPc, seguido pela translocação da H^+ , K^+ ATPase das túbulo vesículas citoplasmáticas para a membrana apical da célula parietal (Revisado por HOU e SCHUBERT, 2006).

1.1.2.2 Mecanismos inibidores da secreção ácida gástrica

A somatostatina é o principal fator inibitório da secreção ácida. No estômago as células produtoras de somatostatina estão intimamente ligadas a células alvo para somatostatina, como as células parietais, ECL e células G, seja por via direta ou indiretamente pela circulação (SCHUBERT e PEURA 2008). Um aumento da acidez no lúmen ativa a liberação de somatostatina no antro e fundo do estômago para que esta exerça um efeito inibitório sobre a secreção.

As prostaglandinas (PGs) inibem a secreção de ácido por ação direta nas células parietais ou indiretamente pela inibição de gastrina. Nas células parietais, as PG inibem a secreção ácida por inibir a secreção de histamina (ATAY *et al.*, 2000). As PGs principalmente PGE₂, inibe a secreção ácida, pela ativação dos receptores EP₃, os quais estão acoplados a proteína Gi (HOOGERWERF e PASRICHA, 2001; GANOG, 2003).

1.1.3 Fatores de agressão e proteção da mucosa gástrica

O trato gastrointestinal é frequentemente exposto a estímulos nocivos que podem causar lesões. Estes estímulos podem ser endógenos como a produção fisiológica do suco gástrico, principalmente HCl e pepsinogênio, alterações de mucosa provocadas por estresse com produção de espécies reativas de oxigênio, além da ingestão de antiinflamatórios não esteroidais, álcool, alimentos em várias temperaturas, infecções por *Helicobacter pylori*, lesões relacionadas à isquemia/reperfusão, entre outros. Em contrapartida a estes estímulos nocivos, a mucosa gastrointestinal apresenta fatores de proteção (DONG e KAUNITZ, 2006).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas constantemente durante alguns processos, como na cadeia transportadora de elétrons (na fosforilação mitocondrial), durante o metabolismo de xenobióticos e durante a resposta inflamatória. O trato gastrointestinal tem a capacidade de produzir grandes quantidades de ERO pelas enzimas oxidases de mucosa como a xantina oxidase, mieloperoxidase (MPO) e NADPH oxidase, encontrada em leucócitos residentes (macrófagos, neutrófilos e eosinófilos) da lâmina própria (DONG e KAUNITZ 2006).

Espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxil ($^{\bullet}OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são moléculas altamente reativas que interagem indiscriminadamente com macromoléculas essenciais, como o DNA, proteínas e lipídeos. Assim, defesas antioxidantes são necessárias para manter a homeostase celular (CNUBBEN *et al.*, 2001).

A defesa da mucosa gástrica pode ser dividida em fatores pré-epiteliais, epiteliais e sub-epiteliais. Esta subdivisão é arbitrária, pois todos os fatores atuam em conjunto para prevenir a mucosa das lesões (FLEMSTRÖM *et al.*, 1999). A produção de bicarbonato pelas células epiteliais superficiais é estimulada pelas prostaglandinas endógenas, óxido nítrico e neurônios aferentes sensíveis à capsaicina, e é regulada pelo ácido luminal (KAGAWA *et al.*, 2003).

O principal componente dos fatores de proteção pré-epiteliais são o muco e o bicarbonato. O muco é produzido pelas células localizadas no pescoço das glândulas gástricas e células epiteliais. É armazenado em grânulos no citoplasma apical dessas células e liberado por exocitose. O muco

é constituído de 95% de água e 5% de glicoproteínas, denominadas de mucina. Os carboidratos compõem 80% do peso das mucinas, que constituem de quatro monômeros similares, ligados por pontes de dissulfeto. A polimerização destas unidades de mucina forma um gel viscoso que adere à superfície do estômago. No entanto, este gel é sujeito à proteólise pelas pepsinas, que clivam as ligações próximas aos centros dos tetrâmeros. Esse processo libera fragmentos que não formam géis e, desta forma, dissolve a camada mucosa protetora. A manutenção da camada de mucina protetora demanda síntese de novas mucinas tetraméricas para substituir aquelas mucinas que são clivadas pelas pepsinas (BERNE *et al.*, 2004).

A camada de muco funciona como uma barreira física protetora entre o epitélio e o lúmen contra agentes nocivos, enzimas, microorganismos e pepsina presente no lúmen. Além disso, mantém o gradiente de pH próximo a neutralidade, impedindo danos a mucosa gástrica. O muco é secretado em todo o trato gastrointestinal desde o estômago até o cólon (LAINE *et al.*, 2008). A secreção de muco é estimulada por hormônios gastrointestinais, incluindo gastrina e secretina, bem como PGE_2 e agentes colinérgicos. Substâncias ulcerogênicas como os antiinflamatórios não estroidais e sais biliares causam a dissipação do muco, levando à lesão gástrica (LAINE *et al.*, 2008).

A secreção pré-epitelial de bicarbonato consiste de uma secreção estável junto à camada de gel aderente, criando um gradiente de pH perto da neutralidade na superfície das células epiteliais, o qual promove a primeira linha de defesa da mucosa do estômago e duodeno contra o ácido secretado no lúmen. O bicarbonato secretado pelas células epiteliais é retido pelo muco

viscoso originando um revestimento pegajoso, viscoso e alcalino. Quando o alimento é ingerido, as taxas de secreção tanto de muco quanto de bicarbonato aumentam. A taxa máxima de secreção de bicarbonato é de aproximadamente 10% da taxa máxima de secreção de HCl (BERNE *et al.*, 2004; LAINE *et al.*, 2008).

As células parietais quando liberam íon H^+ , simultaneamente transportam o íon bicarbonato pela membrana basolateral através da troca de Cl^-/HCO_3^- , que resulta numa maior disponibilidade de bicarbonato. Além disso, para cada íon de H^+ secretado pela célula parietal, uma molécula de CO_2 é convertida em bicarbonato, provocando o que se conhece como maré alcalina após a secreção de ácido gástrico (DONG e KAUNITZ 2006).

A secreção de bicarbonato é intensificada pela acetilcolina liberada dos terminais nervosos próximos às células superficiais epiteliais (BERNE *et al.*, 2004; LAINE *et al.*, 2008).

A proteção epitelial compreende primeiramente os aspectos anatômicos, uma vez que as células epiteliais gástricas têm propriedades intrínsecas de proteção tanto por sua disposição anatômica quanto por sua constituição bioquímica. As junções fechadas e outras barreiras intercelulares controlam a passagem de agentes lesivos do lúmen para a mucosa gástrica, para espaços intersticiais e submucosos. Quando as barreiras gástricas são destruídas e ocorre morte celular, as células necróticas podem ser repostas pela migração de células epiteliais sobreviventes nas bordas da lesão ou pela divisão de células do cólo glandular que migram ate o lúmen e diferenciam-se em células epiteliais superficiais (LAINE *et al.*, 2008).

Além dos aspectos anatômicos, a proteção epitelial também envolve fatores bioquímicos, como um sistema antioxidante. As enzimas que promovem a primeira linha de defesa contra o ânion superóxido e o H_2O_2 incluem a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione S-transferase (GST) (BAYIR H., 2005). A segunda linha de defesa antioxidante é realizada por alguns compostos de moléculas químicas pequenas, incluindo vitaminas, flavonóides da dieta, carotenóides, ácido úrico e a glutathione (GSH) (CNUBBEN *et al.*, 2001).

Em condições de estresse oxidativo, a SOD atua como um sistema de defesa intracelular, degradando o ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (CHANDE e BUDINGER 2007; YASUI e BABA, 2006). Durante um processo inflamatório, neutrófilos liberam ânions superóxido, os quais ativam células endoteliais e aumentam ainda mais a infiltração de neutrófilos (MASINI *et al.*, 2002) através da geração de mediadores quimiotáticos, tais como leucotrieno B4 ou através do aumento da expressão de moléculas de adesão ICAM-1 (CUZZOCREA *et al.*, 2001). Estudos demonstraram que a SOD apresenta um alto poder inibitório da inflamação através da modulação da apoptose dos neutrófilos (YASUI e BABA, 2006).

A CAT é uma enzima que metaboliza o peróxido de hidrogênio (formado na reação com SOD) em água e oxigênio de maneira extremamente rápida. A CAT tem um papel protetor importante contra os efeitos tóxicos dos peróxidos gerados nos peroxissomos e os remove com grande eficácia (SIRAKI *et al.*, 2002).

Existe ainda uma segunda via do metabolismo do H_2O_2 que depende da ativação da GPx e da cooperação da glutathione redutase (GR). A redução do H_2O_2 em água pela GPx é acompanhada da conversão de glutathione da forma reduzida (GSH) para a forma oxidada (GSSG) (KWIECIEN *et al.*, 2002).

Glutathione S-transferase (GST) é uma super família de isoenzimas que catalisam a conjugação de compostos eletrofílicos a GSH, produzindo compostos menos reativos. A GST participa da defesa contra o estresse oxidativo devido a capacidade desta enzima em detoxificar compostos endógenos que causam danos (CNUBBEN *et al.*, 2001). GSH é um tripeptídeo com potente atividade antioxidante e propriedade de cofator enzimático, importantes para regulação da atividade celular. Sob condições de estresse oxidativo, as espécies reativas de oxigênio são reduzidas por GSH com concomitante formação de GSSG (ou glutathione oxidada). Apesar de sua resistência a oxidação espontânea, o GSH reage rapidamente e de forma não enzimática com o radical hidroxila, com N_2O_3 e peroxinitrito. Para manter o equilíbrio redox celular, o GSSG é exportado das células por proteínas de transporte dependentes de ATP, implicando que condições severas de estresses diminuem níveis celulares de GSH. Esta depleção de GSH está relacionada com a patofisiologia de muitas doenças, sugerindo um importante papel do GSH na manutenção da integridade dos sistemas fisiológicos (CNUBBEN *et al.*, 2001).

A proteção subepitelial do estômago envolve a microcirculação, pois o fluxo sanguíneo protege a mucosa por assegurar a chegada de uma quantidade ótima de oxigênio, nutrientes, bicarbonato, além de remover

substâncias tóxicas. (WALLACE, 2001). As células endoteliais dos microvasos geram potentes vasodilatadores como o óxido nítrico (NO) e prostaciclina (PGI_2), os quais protegem a mucosa gástrica contra fatores agressores e se opõem a ação danosa de vários agentes vasoconstritores como os lecotrienos C_4 , tromboxano A_2 e endotelina. PGI_2 e NO mantêm a viabilidade endotelial e previnem a aderência de plaquetas e leucócitos nas células endoteliais de microvasos, prevenindo assim a o comprometimento da microcirculação. (WALLACE, 2001; LAINE *et al.*, 2008).

Quando a mucosa gástrica é exposta a agentes irritantes, ocorre um rápido aumento do fluxo sanguíneo, permitindo a remoção e/ou diluição de agentes lesivos.

A geração contínua de PGE_2 e PGI_2 é crucial para a manutenção da integridade da mucosa e proteção contra agentes ulcerogênicos e necrozantes. Quase todos os mecanismos de defesa são estimulados e/ou facilitados pelas PGs, os quais incluem a inibição da secreção ácida, estimulação da secreção de muco, bicarbonato e fosfolípidos, aumento do fluxo sanguíneo, aceleração da restituição epitelial e cicatrização da mucosa. PGs também inibem a ativação de mastócitos, leucócitos, aderência plaquetária no endotélio vascular. A maioria das ações protetoras das PGs na mucosa gástrica são mediadas principalmente por receptores do tipo EP_1 , já os receptores EP_3 e EP_4 afetam a secreção de ácido e muco respectivamente (LAINE *et al.*, 2008).

Quando os níveis superficiais da defesa da mucosa falham ou há uma lesão luminal, o próximo nível de defesa é a resposta inflamatória aguda. Os neutrófilos migram da circulação para o local da lesão pra facilitar o reparo e

reduzir a entrada de microrganismos na circulação sistêmica (WALLACE, 2001).

Os leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) são as primeiras células a serem recrutadas pelo sistema imune e possuem um papel crucial no desenvolvimento da resposta inflamatória. A ativação de receptores acoplados a proteína G causa um aumento de cálcio citosólico que age como segundo mensageiro e induz uma série de eventos, resultando na “ativação” da resposta celular dos neutrófilos. Essa resposta inclui a liberação de espécies reativas de oxigênio, geradas predominantemente pela NADPH oxidase, exocitose das enzimas proteolíticas como leucócitos elastase ou catepsina G. Elevados níveis de EROs e liberação de proteases são eventos típicos da reação inflamatória (POECKEL *et al.*, 2008).

1.1.4 Úlcera Péptica

Úlcera é uma lesão profunda da mucosa, onde tanto os componentes do tecido epitelial e conectivo, incluindo miofibroblastos subepiteliais, células do músculo liso, vasos e nervos podem estar destruídos (MILANI E CALABRO, 2001). O termo “ulcera péptica” compreende tanto as úlceras gástricas (estomacais) como as duodenais. Em geral, as úlceras ocorrem mais comumente no duodeno, onde 90% estão localizadas a 3 cm da junção do piloro com a mucosa duodenal. No estômago as úlceras se localizam mais comumente no antro (60%) e na junção do antro com o corpo na pequena curvatura (25%). A úlcera péptica é um dos distúrbios mais comuns que afetam o sistema gastrointestinal. A incidência de úlcera péptica durante a vida é superior a 10%, com um pico que ocorre entre 65 e 74 anos, sendo

ligeiramente maior nos homens do que em mulheres (OFMAM, 2000; ABITOL, 2005).

É inquestionável que as doenças como refluxo gastro-esofágico e úlcera péptica diminuem a qualidade da vida das pessoas, resultando em custos substanciais diretos e indiretos (OFMAM, 2000).

A fisiopatologia das úlceras pépticas é considerada um processo multifatorial, que pode ser atribuído ao desequilíbrio entre fatores agressivos (como o ácido clorídrico, a pepsina, infecção por *Helicobacter pylori* além de anti-inflamatórios não esteroidais, fumo e álcool) e defesas locais da mucosa (como a secreção de bicarbonato, muco, PGs, fluxo sanguíneo e óxido nítrico). Embora o tratamento seja freqüentemente conduzido para a redução dos fatores agressivos, pode também ser dirigido para o fortalecimento das defesas da mucosa do estômago e duodeno (VENKATARANGANNA et al 1998; JAIN et al 2006). Vale ainda ressaltar que a úlcera péptica é considerada doença crônica, e a recorrência anual é esperada na maioria dos casos (BRUNTON et al., 2006).

A presença da bactéria *Helicobacter pylori* tem sido associada com a geração de ERO, podendo gerar um estresse oxidativo na mucosa gástrica. Alguns testes têm demonstrado que a inclusão de antioxidantes como beta-caroteno e vitamina E na dieta resultaram na diminuição da incidência de câncer gástrico, evidenciando o papel crucial do estresse oxidativo na formação do cancer gástrico (AREND et al., 2005). No entanto, as úlceras pépticas causadas pela infecção de *H. pylori* geralmente são tratadas com a combinação de antibióticos e de medicações anti-secretoras. Este regime

complexo de tratamento e os efeitos colaterais, como uma hipergastrenemia podem limitar o seu uso (ROBERTSON *et al.*, 2003).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) são largamente utilizados para o tratamento da dor, febre e inflamação. Efeitos adversos dos AINES incluem dano da mucosa gastro-intestinal, além de agravamento de ulcerações pré-existentes. Esses efeitos deletérios são atribuídos a sua capacidade de reduzir a produção de PGs através da inibição da enzima cicloxigenase (COX), além de uma ação irritante local, ativação de neutrófilos e diminuição da microcirculação. Estes mecanismos podem conduzir a oclusão de micro vasos e subsequente super produção de metabólitos reativos a oxigênio. Essas substâncias são capazes de induzir a lesão tecidual oxidativa, que parece ter papel importante na patofisiologia da ulceração na mucosa gástrica induzida por AINES (BRZOZOWSKI, 2003 e FORNAI *et al.*, 2005).

A cicatrização das úlceras requer angiogênese no tecido de granulação na base da úlcera, junto com proliferação das células epiteliais na margem da úlcera e conseqüente restabelecimento da arquitetura glandular. A proliferação epitelial e endotelial é largamente conduzida pelos fatores de crescimento. No caso da angiogênese, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) aparece entre os mais importantes. VEGF é liberado pelas próprias células endoteliais e pelas plaquetas (WALLE, 2005).

O processo inicial de cicatrização das úlceras é acompanhada pelo aumento do fluxo sanguíneo na área ulcerada, dos níveis plasmáticos de gastrina e de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e IL-1 β (interleucina do tipo 1 beta), as quais tem seus níveis reduzidos

ao longo da cicatrização. A hipergastrinemia observada no período inicial da cicatrização pode ser atribuída à extraordinária supressão ácida gástrica e expressão de fatores de crescimento como EGF, TGF- α e HGF, os quais controlam a proliferação celular e são bem conhecidos por exibirem atividade antissecretora (BRZOZOWSKI 2003).

Na década de quarenta, estudos sugeriam que fatores nutricionais e uma ingestão normal de proteínas poderiam proteger a mucosa contra a ulceração. Até o século XIX, apenas uma dieta “light” era recomendada para tratar doenças relacionadas à secreção ácida gástrica como as úlceras pépticas. No mundo de hoje pode-se considerar que além da má alimentação, o estresse e a preocupação estão entre as principais causas que contribuem para o surgimento de úlceras pépticas (LIPKING 1971; JAIN *et al.*, 2007).

Por mais de um século, as úlceras pépticas foram controladas cirurgicamente, com altas taxas de morbidade e mortalidade. O tratamento farmacológico resumia-se em neutralizar a acidez gástrica estomacal com a utilização de antiácidos, como bicarbonato de sódio (NaH_2CO_3), carbonato de cálcio (CaCO_3), hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) e hidróxido de magnésio ($\text{Mg}(\text{OH})_2$) ou associações. Porém, por alterar o pH gástrico e urinário, os antiácidos tem a capacidade de interagir com uma variedade de fármacos através de interações farmacocinéticas de dissolução e absorção, biodisponibilidade e eliminação renal. Alguns podem também quelar outras drogas presentes no trato gastrointestinal, formando complexos insolúveis que passam pelo TGI sem serem absorvidos. Além disso, dependendo do paciente, os efeitos associados ao uso de anti-ácidos incluem constipação ou diarreia,

sendo utilizados hoje em dia principalmente para o alívio rápido dos sintomas da úlcera péptica (YUAN *et al.*, 2006; BRUNTON *et al.*, 2006).

Antagonistas muscarínicos como a pirenzepina inibem a secreção ácida bem como a motilidade gástrica, mas o uso clínico destas drogas diminuiu por causa da disponibilidade de medicamentos anti-secretores mais eficazes (JAIN *et al.*, 2007).

O desenvolvimento das drogas ao longo dos anos indica a mudança gradual no foco de tratamento, o qual surgiu com o descobrimento de antagonistas H_2 como Cimetidina (1976) e Ranitidina (1982) até o aparecimento dos inibidores da bomba de prótons (1988) como Omeprazol, seguido por Lansoprazol (1995), Rabeprazol (1999), Pantoprazol e Esomeprazol (2001). Os antagonistas do receptor de histamina foram usados extensivamente para a supressão ácida por mais de 25 anos (JAIN *et al.*, 2007).

Os inibidores da bomba de prótons são pró-fármacos, necessitando ativação em ambiente ácido. Entram na célula parietal a partir do sangue e, devido a sua fraca natureza básica, acumulam-se em canalículos secretores ácidos da célula parietal, onde são ativados por um processo catalisado por prótons que resulta na formação de uma sulfenamida tiofílica ou ácido sulfênico. Esta forma ativada reage por meio de ligação covalente com o grupo sulfidril de cisteínas do domínio extracelular da H^+/K^+ -ATPase, resultando em uma inativação irreversível da bomba. A secreção do ácido só se reinicia após a síntese e inserção de novas moléculas de H^+/K^+ -ATPase na membrana luminal. (YUAN *et al.*, 2006; BRUNTON *et al.*, 2006).

Hoje, quase duas décadas após a introdução do primeiro inibidor da bomba de prótons, esses fármacos começam a apresentar alguns inconvenientes, tornando-se então uma linha de estudo de grande interesse. A supressão ácida extrema, mesmo que em doses recomendadas, podem resultar em acloridia (ausência de ácido clorídrico), desencadeando infecções entéricas como a febre tifóide, cólera e disenteria (JAIN *et al.*, 2007). Trabalhos de STOLTE e colaboradores (1998), UEMURA e colaboradores (2002) e SUZUKI e colaboradores (2002) relatam que pacientes *H. pylori* positivo em tratamento tanto com Omeprazol, Lanzoprazol e Ranitidina apresentam mudanças no padrão da gastrite, com conseqüente ativação de neutrófilos (através do aumento da atividade da enzima mieloperoxidase) no corpo gástrico. Outro estudo recente confirma que a supressão ácida extrema induz interações leucocitárias no endotélio via liberação de gastrina. Esse hormônio é um estimulante da secreção ácida gástrica e considerado um agente pró-inflamatório, contribuindo “in vivo” para a inflamação causada pela *H.pylori* (ALVAREZ *et al.*, 2006 e 2007).

Em virtude desses inúmeros inconvenientes apresentados pelos tratamentos antiulcerosos, tem sido contínua e importante a investigação de novas drogas para o tratamento de doenças ácido-péticas.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi verificar o potencial cicatrizante do extrato etanólico de *Arctium lappa* L. em úlceras gástricas estabelecidas através do modelo do ácido acético e possíveis mecanismos envolvidos.

2.1 Objetivos específicos:

1. Avaliar os efeitos do extrato etanólico das raízes de *Arctium lappa* L. na cicatrização de lesões gástricas induzidas com ácido acético em ratos;
2. Avaliar a ação do extrato sobre o processo cicatricial através de cortes histológicos da mucosa gastrointestinal;
3. Avaliar a ação do extrato sobre a redução da secreção ácida gástrica, utilizando o modelo de ligadura do piloro;
4. Avaliar a ação do extrato sobre a quantidade de muco na região glandular gástrica;
5. Avaliar a ação do extrato no extravazamento capilar na região da lesão gástrica;
6. Avaliar o efeito do extrato sobre a migração de neutrófilos e mononucleares através da determinação da atividade enzimática das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-glicosidase (NAG), respectivamente, na região da lesão gástrica;
7. Avaliar a ação antioxidante *in vitro* do extrato no modelo do DPPH;
8. Avaliar o efeito do extrato sobre os níveis de superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), grupos sulfidrílicos não proteicos (GSH), peroxidação lipídica (LPO) e radicais livres na mucosa gástrica.
9. Verificar por meio de testes funcionais *in vitro* utilizando a musculatura circular do estômago de ratos se o extrato atua em receptores muscarínicos e histaminérgicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Botânico

3.1.1 Origem:

A *Arctium lappa* L. foi fornecida pela Fazenda Solidariedade, da Fundação de Ação Social (FAS). A área para cultivo e as plantas matrizes foram selecionadas pela farmacêutica industrial Jorgeth A. G. Xavier. As raízes coletadas em novembro de 2003, foram cortadas, secas em estufa e embaladas em sacos plásticos e de papel. Os sacos, devidamente identificados, foram armazenados em galpões apropriados, no laboratório da própria fazenda, e posteriormente enviados ao laboratório do Departamento de Farmacologia (UFPR). Uma exsicata foi identificada com o nº 37173 e está depositado no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

3.1.2 Preparação do extrato:

O extrato da raiz da Bardana foi fornecido pelo Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob a responsabilidade do Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti.

Para a obtenção do extrato, 7 kg do pó das raízes da Bardana foi percolado com 14 L de etanol, após a evaporação do solvente, em rotaevaporador e liofilização, foi obtido 210 g do extrato etanólico (EET).

- **Obtenção das soluções do extrato para sua utilização nos ensaios *in vivo*:**

O extrato foi diluído em água destilada a frio, para doses de 1, 3, 10, 30, e 100 mg/Kg.

3.2 Animais

Foram utilizados ratas (*Ratus norvegicus*, variedade Wistar) adultas, com peso variando entre 180 a 250 g fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal do Paraná e mantidos sob condições controladas de temperatura e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas), com acesso livre à água e ração.

Os protocolos experimentais que utilizaram animais estão de acordo com as normas internacionais e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPR, com o número de protocolo 576.

3.3 Lesões gástricas induzidas por ácido acético.

As lesões gástricas induzidas por ácido acético seguem a metodologia originalmente proposta por OKABE et al, 1971, com poucas modificações (WALACE, J.L. et al, 2007).

As ratas fornecidas pelo Biotério da UFPR (grupos de 6 animais) foram submetidas a um jejum sólido por 18 horas antes da indução das lesões. Os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina (10 mg/Kg e 5 mg/kg, i.p., respectivamente), tendo a parede abdominal aberta e o estômago exposto. A figura 3 ilustra a metodologia de indução de úlceras, na qual um cilindro de vidro de 6 mm de diâmetro foi aplicado sobre a serosa do estômago, no qual foi injetado 500 µL de ácido acético 80%. Após 1 minuto, o ácido foi aspirado e

substituído por salina para limpeza do local. Em seguida a salina foi aspirada, o local foi seco com o auxílio de uma haste com algodão. Então, o cilindro foi retirado da superfície do estômago e a parede abdominal foi suturada.

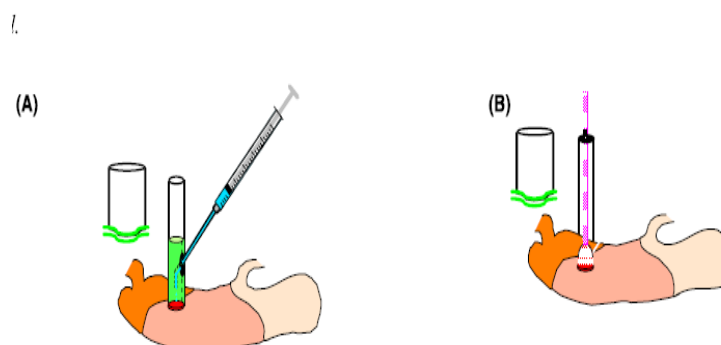


Figura 3. Metodologia de indução de úlcera por ácido acético A: aplicação de ácido acético no tubo cilíndrico em contato com a mucosa; B: Aspiração do ácido e limpeza com uma haste com de algodão. (adaptado de Konturek et al, 2008).

Após a recuperação da anestesia, os animais retornaram ao biotério e permaneceram sob regime de restrição alimentar com consumo livre de água até o dia seguinte. Então, seguiu-se uma dieta alimentar, na qual a ração foi oferecida duas vezes ao dia, por uma hora cada, durante todo o período do tratamento. O tratamento consistiu na administração por via oral de veículo (água - 0,5 mL/200g), omeprazol (40 mg/kg), diferentes doses do extrato da Bardana (1, 3, 10, 30 e 100 mg/kg) e ácido ascórbico (250 mg/kg). O tratamento foi iniciado no segundo dia após a cirurgia, administrado trinta minutos após o consumo da ração e teve duração de sete dias. Ao final do

tratamento, os animais foram sacrificados e o estômago removido e esticado para posterior análise. A avaliação das lesões gástricas foi feita pela medida do comprimento x altura (mm^2) da úlcera, utilizando uma régua graduada.

3.4 Análise histológica

Estômagos previamente submetidos a lesão gástrica induzida por ácido acético foram utilizados para verificar a participação do extrato no processo cicatricial. O método para avaliação histológica foi realizado de acordo com Kallaya e colaboradores (2006). Parte de amostras dos estômagos foram fixadas com 10% de uma solução tampão de formalina e embebida em parafina. As amostras foram cortadas em finas seções de 5 μm e coradas com hematoxilina-eosina. Mudanças histopatológicas e a extensão das lesões foram observadas em microscópio.

3.5 Avaliações dos níveis de expressão da proteína PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) por método imunohistoquímico.

A pesquisa imunohistoquímica da expressão de PCNA foi realizada para avaliar os efeitos do extrato sobre a cicatrização da mucosa gástrica ulcerada. Amostras teciduais provenientes da área ulcerada pela exposição ao ácido acético foram emblocadas previamente em parafina e cortadas em micrótomo com espessura de 5 μm , como descrito anteriormente. As amostras foram desparafinizadas e re-hidratadas. Os cortes foram tratados com peróxido de

hidrogênio em metanol a 3% por 10 min. Em seguida os cortes foram tratados com tampão fosfato (PBS) com 1% de albumina sérica bovina (BSA) e 0,01% de saponina por 30 min, para redução de marcação não específica e permeabilização celular. Então os cortes foram incubados com anticorpo primário anti-PCNA diluído em PBS/BSA 1% e 0,01% de Triton-X em temperatura ambiente em câmara úmida por 2 h, após este tempo os cortes foram lavados com PBS/BSA 1%. Posteriormente, as secções foram incubados com anticorpo secundário conjugado a peroxidase diluído 1:200 em PBS/BSA 1% em temperatura ambiente em câmara úmida por 1 h. Os sítios de ligação para peroxidase foram detectados por coloração usando cromógeno diaminobenzidina (Kit de substrato DAB), incubadas por 15 min. O excesso de cromógeno foi retirado em água corrente. Dentre todas as etapas, os cortes foram lavados duas a três vezes com PBS. Finalmente, as lâminas contendo os cortes foram desidratadas, clareadas com xilol e montadas com Bálsamo do Canadá (ATHAR *et al.*, 2004). Para avaliação da marcação dos cortes foi utilizada lente ocular graduada e a marcação foi avaliada em áreas representativas com aumento de 400x. A quantificação de células com marcação positiva para PCNA foi realizado em 3 cortes histológicos distintos de cada grupo observando-se 5 campos diferentes em cada corte. A quantificação foi expressa em número de células marcadas positivamente por foto utilizando o programa ImageJ® versão 1,41 (Instituto Nacional de Saúde, EUA).

3.6 Determinação do muco gástrico

O muco gástrico foi medido usando as porções glandulares (corpo e antro) obtidos de estômagos ulcerados com lesões gástricas induzidas por ácido acético. O tecido gástrico foi pesado e imediatamente transferido para uma solução de Alcian Blue 0,1% preparada em uma solução de sacarose 0,16 mM e acetato de sódio 50 mM (pH 5). O tecido foi mantido nesta solução por 2 horas em temperatura ambiente. Logo após, os segmentos foram lavados duas vezes com solução de sacarose 250 mM durante 15 e 45 minutos. Depois, o conteúdo de corante no tecido complexado com o muco gástrico foi extraído com solução de cloreto de magnésio 500 mM durante 2 horas. O material extraído foi então misturado com igual volume de éter dietílico e centrifugado à 3600 rpm por 10 minutos. A absorbância foi determinada em comprimento de onda de 598 nm. O conteúdo de muco foi calculado usando uma curva padrão de Alcian Blue (6,25–100 µg), e os resultados foram expressos em µg Alcian Blue/g tecido (CORNE *et al.*, 1974).

3.7 Determinação da permeabilidade microvascular

A permeabilidade microvascular foi avaliada através da medida da quantidade de extravasamento de azul de Evans na mucosa gástrica de acordo com metodologia descrita por Takeuchi e colaboradores (1987). Para isso, os animais foram submetidos à lesão gástrica induzida por ácido acético como descrito anteriormente, o tratamento com o extrato de Bardana (10 mg/kg, v.o.) foi iniciado no segundo dia após a cirurgia, duas vezes ao dia, durante sete

dias, com dieta alimentar igual àquela descrita anteriormente. Ao final do tratamento, 1 ml de azul de Evans a 1% (w/w) foi injetado através da veia jugular e 30 minutos após os animais foram sacrificados. Os estômagos foram retirados e a porção contendo a lesão foi isolada, pesada e incubada em tubos contendo formamida por 12 horas, de acordo com metodologia descrita por Ukada e colaboradores (1970). A concentração de corante foi quantificada por espectrofotometria com absorvância em 620 nm e o conteúdo de corante calculado através de uma curva padrão de Evans Blue (1-100 µg/ml). Os resultados foram expressos em µg de azul de Evans / g de tecido.

3.8 Estudo *in vitro* da atividade seqüestradora de radicais livres (DPPH)

A atividade do extrato da Bardana em reduzir o radical livre estável 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) foi determinada através de medidas de alteração da absorvância a 517 nm, de acordo com o método descrito por BLOIS (1958) e por CHEN e colaboradores (2004), com algumas modificações. O sistema de reação foi constituído de 750µL de solução teste (extr ato) e 250 µL de solução metanólica de DPPH (1 mg em 25 mL). Após 5 minutos, o decréscimo da absorvância foi medido. Solução do agente redutor ácido ascórbico (50 µg/mL) foi utilizada como controle positivo do teste e como grupo controle negativo foi adicionado água com 0,32 % de DMSO (veículo).

3.9 Métodos bioquímicos.

- **Concentração de proteína nas amostras**

A concentração de proteína foi determinada em placa de 96 poços utilizando o kit “BCA TM protein assay kit” (PIERCE, Rockford, IL), utilizando

albumina bovina como padrão e realizado segundo as instruções fornecidas pelo kit.

- **Preparação do tecido ulcerado para os ensaios bioquímicos.**

Após a análise da lesão, as atividades enzimáticas de mieloperoxidase (MPO), N-acetilglucosaaminidase (NAG), superóxido-dismutase (SOD) e catalase (CAT), além das quantidades de grupos sulfidrílicos não proteicos (GSH), peroxidação lipídica (LPO) e espécies reativas de oxigênio na mucosa gástrica foram determinadas. Para isso as porções ulceradas (incluindo a base e a margem da úlcera) foram isoladas, pesadas e homogeneizadas em 0,6 ml de tampão fosfato 200 mM pH 6,5. Imediatamente, o homogenato obtido foi utilizado para a quantificação dos níveis de GSH e radicais livres.

Para as análises de SOD, CAT, MPO, NAG e LPO o homogenato foi centrifugado por 20 minutos a 9000 g utilizando uma ultracentrífuga. Para aproveitar ao máximo o material centrífugado, o precipitado foi utilizado para a determinação da atividade das enzimas MPO e NAG, enquanto o sobrenadante para as demais determinações.

3.9.1 Quantificação dos níveis enzimáticos de mieloperoxidase (MPO)

A MPO é uma enzima encontrada primariamente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e comumente usada como um marcador do conteúdo tecidual de leucócitos polimorfonucleares como os neutrófilos que migram para o local do estímulo inflamatório. O princípio do método baseia-se na liberação de MPO para o tecido lesado.

O homogenato produzido com a parte ulcerada adicionado de tampão fosfato de potássio (200 mM) pH 6,5 foi centrifugado a 9000 g durante 20 minutos. O precipitado obtido foi ressuspendido com 1 mL de tampão fosfato de potássio 80 mM na presença de 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). Após a homogeneização as amostras foram centrifugadas a 11000 g por 20 minutos a 4 °C. Em placas de 96 poços foram adicionados em triplicata 30 µl do sobrenadante de cada amostra em triplicata, ou água destilada nos poços usados como branco do ensaio, acrescido de 220 µl de uma solução contendo: 100 µl de tampão fosfato 80 mM, 85 µL de tampão fosfato 22 mM e 15 µl de H₂O₂ 0,017%. A reação foi iniciada com a adição de 20 µl de tetrametilbenzidina (TMB), um substrato enzimático que resulta num produto colorido. A amostra foi então incubada por 3 minutos a 37 °C, e a reação foi interrompida pela adição de 30 µl de acetato de sódio 1,46 M (pH = 3,0). A atividade enzimática foi determinada em espectrofotômetro a 620 nm. Os resultados foram expressos como unidade de densidade óptica (D.O)/mg de proteína/ 3 minutos.

3.9.2 Determinação “in vitro” da atividade enzimática de mieloperoxidase (MPO)

Para verificar se o extrato possui efeito inibitório direto, *in vitro*, sobre a atividade da enzima mieloperoxidase, decidiu-se realizar outro experimento, no qual o extrato foi incubado diretamente com amostras de tecido não lesados e tecidos ulcerados. As amostras teciduais foram preparadas conforme o protocolo descrito anteriormente. As amostras teciduais ulceradas

ou lesadas representa amostras de úlceras obtidas dos animais tratados somente com veículo, ou seja água, portanto com esperado nível de leucócitos polimorfonucleares e consequentemente MPO. Para a realização do teste foi utilizada placa de 96 poços, onde foram adicionados 30 µl do sobrenadante de cada amostra por poço, ou água destilada nos poços usados como branco do ensaio e em seguida o extrato foi incubado por 15 minutos a temperatura ambiente em diferentes concentrações (0, 3, 1, 10 e 30 mg/ml) nos diferentes grupos de amostras. Após esse período de incubação procede-se com a adição de H₂O₂ e TMB. A atividade enzimática foi determinada em espectrofotômetro a 620 nm. Os resultados foram expressos como unidade de densidade óptica (D.O)/mg de proteína.

3.9.3 Determinação da atividade enzimática da N-acetilglucosamidase (NAG)

A atividade da NAG é baseada na hidrólise do p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosamina (substrato) pela N-acetil-β-D glucosamidase, liberando p-nitrofenol (Bailey, 1988). Amostras contendo 25 µl do sobrenadante obtido pelo processo de centrifugação descrito anteriormente, ou 25 µl de água destilada (branco do ensaio) foram incubadas com 100 µl de tampão citrato (5 mM, pH 4.5) na presença do substrato (2,24 mM). As placas foram incubadas por um período de 60 minutos a 37 °C e a reação foi interrompida com tampão glicina (200 mM, pH 10,4) e mensurada em espectrofotômetro a 405 nm. Os resultados foram expressos como unidade de densidade óptica (D.O)/mg de proteína/hora.

3.9.4 Quantificação de grupos sulfidrílicos não protéicos (GSH) na região glandular gástrica.

Estômagos previamente submetidos ao ácido acético foram utilizados para verificar o efeito protetor do extrato de Bardana na mucosa gástrica, através dos níveis de grupos sulfidrílicos não protéicos (GSH). Os níveis de GSH na mucosa gástrica foram determinados através do método de Sedlak e Lindsay (1968). A parte glandular da mucosa gástrica foi pesada e diluída em tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 6,5), no qual foi preparado um homogenato. Para desnaturar e precipitar as proteínas presentes no homogenato, 50 µl deste homogenato foi adicionado a 40 µl de ácido tricloroacético (ATC) 12%, agitados por 10 minutos e centrifugados por 15 minutos a 900 g. Alíquotas de 10 µl do sobrenadante, ou de água destilada (para o branco) foram adicionadas de 290 µl de tampão TRIS 0,4M (pH 8,9) e foram colocadas em placa de 96 poços. A reação foi iniciada com a adição de 5 µl de DTNB (5,5'-ditiobis 2-ácido nitrobenzóico) 1 mM, 5 minutos antes da leitura espectrofotométrica (415 nm). Os procedimentos foram realizados a 4 °C e os valores individuais interpolados numa curva padrão de GSH e expressos em µg GSH/g tecido.

3.9.5 Quantificação da atividade enzimática da catalase (CAT) na região glandular gástrica.

Estômagos previamente submetidos ao ácido acético foram utilizados para verificar o efeito do extrato de Bardana na atividade da CAT durante o processo de proteção da mucosa.

A determinação da atividade da CAT presente na mucosa gástrica foi realizada com base no método de Aebi (1984). A mucosa gástrica foi homogeneizada em tampão fosfato pH 6,5. Em uma cubeta de quartzo contendo 990 µl de uma solução 20 mM (Tampão Tris/ EDTA 5mM, pH8,0, peróxido de hidrogênio 30% e água destilada) foram adicionados 10 µl da amostra diluída; ou no caso do branco, 10 µl de água destilada. A absorbância foi então medida a 240 nm.

3.9.6 Quantificação dos níveis de superóxido dismutase (SOD) na região Glandular Gástrica.

Estômagos previamente submetidos ao ácido acético foram utilizados para verificar o efeito protetor do extrato de Bardana na mucosa gástrica, através da participação da enzima superóxido dismutase (SOD). A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método de Marklund e Marklund (1974) e baseia-se na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação do pirogallol. As reações foram realizadas em tampão Tris HCl 200 mM com EDTA 2 mM em pH 8,5 a temperatura ambiente.

Em um tubo de polipropileno foram adicionados Tampão Tris - EDTA e 20 µl de amostra. Após agitação em vortex, 25 µl de pirogallol 1 mM foram adicionados e a solução foi incubada por 20 minutos. A reação foi interrompida com 12,5 µl de HCl 1N. Os tubos de polipropileno foram centrifugados por 4 minutos a 18500 g e 300 µl do sobrenadante pipetados em microplaca para leitura em espectrofotômetro a 205 nm. Os resultados foram comparados com

o controle (Tampão Tris-EDTA com pirogalol sem incubação + média sem amostra e sem incubação), sendo este valor igual a 100%. A quantidade de proteína que inibiu a reação em 50% (IC_{50}) equivale a 1 unidade (U) de SOD. Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína.

3.9.7 Determinação intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs).

A determinação de espécies reativas de oxigênio foi realizada de acordo com Keston e Brandt (1965) com modificações de Song e colaboradores (2008).

O ensaio consistiu na oxidação da sonda fluorescente DCFH (diclorofluoresceína) por espécies reativas de oxigênio e/ou espécies reativas de nitrogênio, a fluorescência emitida foi medida em um espectrofluorímetro (TSUCHIYA *et al.*, 1994). Para a realização deste método, as amostras (porção ulcerada, incluindo base e margem da úlcera) foram utilizadas para o preparo do homogenato. As amostras foram pesadas, aproximadamente 100 mg e homogeneizadas em 2 ml de tampão TRIS-EDTA (1 mM- 5 mM) pH 8,5. O homogenato (500 μ l) foi incubado com 25 μ l de DCFH-DA (1 mM) por 40 minutos ao abrigo da luz. Após o período de incubação a fluorescência foi mensurada em espectrofluorímetro usando cubeta de quartzo. Todas as medidas foram feitas utilizando comprimento de onda com excitação de 488 nm e emissão de 520 nm.

3.9.8 Determinação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH).

O total de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) na mucosa gástrica foi medida através do ensaio de oxidação de ferro II na presença de xilenol laranja (JIANG *et al.*, 1991). Para isso, as áreas ulceradas (base e margem da ulcera) foram homogeneizadas em metanol P.A (1:4) e centrifugadas por 20 minutos em 9000 g (4 °C). O sobrenadante e o reativo de foram adicionados em placas de 96 poços e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente. A leitura foi feita em espectrofotômetro com comprimento de onda de 560 nm. A concentração de LOOH foi determinada para cada 1 mg de proteína presente no homogenato.

3.10 Avaliação da atividade anti-secretora ácida: Ligadura de Píloro

Os animais foram mantidos em jejum de 15 a 18 horas com acesso livre a água. Ratas foram anestesiadas com xilazina e cetamina (10 mg/Kg e 5 mg/kg, i.p., respectivamente) e colocadas em decúbito dorsal em uma placa de isopor. Através de uma incisão de cerca de 2 cm no abdômen, foi localizado o estômago e procedido a ligadura do píloro utilizando fio de sutura. Por via intraduodenal, os animais recebem o veículo (0,1 ml/100 g) e diferentes doses do extrato (10 30 e 100 mg/kg). O grupo omeprazol (40 mg/kg) recebeu o tratamento via oral, 40 minutos antes da ligadura do píloro, sendo administrado o mesmo volume de salina intraduodenal. A seguir, a parede abdominal foi suturada. Quatro horas após a cirurgia, os animais foram sacrificados e seus estômagos removidos após pinçamento do esôfago para evitar perda do

material secretado. O órgão foi lavado com água, seco em gaze e aberto ao longo da curvatura menor. A mucosa foi lavada com 3 ml de água destilada, recolhendo-se o conteúdo gástrico em tubos de ensaios para a centrifugação (1500 rpm durante 30 minutos). Após a centrifugação, o volume gástrico foi quantificado e a acidez total ($\text{mEq}[\text{H}^+]/\text{mL}/4$ horas) foi quantificada por titulação simples com NaOH 0,1 N, utilizando fenolftaleína 2 % como indicador ácido-base (DOMER, 1971).

3.11 Estudo do mecanismo de ação anti-secretor ácido: avaliação da atividade anti-secretora ácida estimulada por Pentagastrina, Betanecol e Histamina

A ligadura pilórica foi realizada conforme explicado no item anterior. Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos grupos: betanecol + salina; betanecol + atropina; betanecol + extrato; pentagastrina+ salina, pentagastrina + extrato; histamina + salina, histamina + ranitidina; histamina + extrato. No momento da ligadura por via intraduodenal os animais receberam o veículo (água - 0,1 ml/100 g), ou ranitidina (50 mg/kg), ou atropina (1 mg/kg) ou a dose do extrato que apresentou melhor efeito na diminuição da secreção ácida (10 mg/kg). A seguir, a parede abdominal foi suturada e após 1 hora da ligadura os animais receberam os estímulos secretogogos por via subcutânea: histamina (20 mg/Kg), betanecol (2,5 mg/Kg), ou pentagastrina (0,4 mg/Kg). Quatro horas após a cirurgia, os animais foram sacrificados e os estômagos foram removidos após o pinçamento do esôfago para evitar a perda do material secretado. O órgão foi lavado com água, secado em gaze e aberto ao longo da curvatura menor. A mucosa foi lavada com 3 mL de água destilada, recolhendo-se o suco

gástrico em tubos de ensaios para a centrifugação (9000g durante 20 minutos). Após a centrifugação, o volume e a acidez gástrica foram quantificados como descrito anteriormente.

3.12 Estômago isolado de rato.

Preparação do tecido

Após permanecerem em jejum alimentar de 12 horas, as ratas foram sacrificadas, o estômago foi retirado, aberto no sentido da curvatura menor, e fitas sero-musculares das paredes anterior e posterior do fundo gástrico medindo aproximadamente 0,5 cm de largura e 2 cm de comprimento foram retiradas. O maior eixo dos segmentos era paralelo à orientação das fibras musculares circulares. Essas tiras foram acondicionadas, através de hastes conectadas a transdutores, em cubas de vidro contendo solução nutritiva de Krebs em mM: NaCl 110,8; KCl 5,9; NaHCO₃ 25,0; MgSO₄ 1,07; CaCl₂ 2,49; NaH₂PO₄ 2,33 e glicose 11,51; aerados com carbogênio (95% O₂/5% CO₂), mantidos a uma temperatura de 37 °C. A preparação foi submetida a uma tensão basal de 1 g, seguido por um período de equilíbrio de 1 hora. Durante este período a solução de Krebs foi renovada a cada 20 minutos.

Protocolo experimental

Com o objetivo de investigar o envolvimento do sistema colinérgico nas ações causadas pelo extrato etanólico de *Arctium lappa* L., após o período de equilíbrio, foi realizada uma curva cumulativa concentração-resposta de contração para acetilcolina (1nM a 1mM). Em seguida, a solução de Krebs foi

renovada a cada 20 minutos por um período de 60 minutos. Passado este período, foi realizada uma nova curva cumulativa concentração-resposta de contração para acetilcolina na ausência ou na presença de atropina (0,1 mM) ou do extrato etanólico de *Arctium lappa* L. (0,1; 0,3 e 1 mg/l). Em outra série de experimentos, foi investigado o envolvimento do sistema histaminérgico. O tecido foi contraído pela adição de cloreto de bário (30 mM) e quando o platô de contração estava estabelecido, uma curva concentração-resposta de relaxamento para histamina (1 nM a 10 μ M) foi realizada na ausência ou presença da ranitidina (10 mM) ou do extrato etanólico de *Arctium lappa* L. (0,1; 0,3 e 1 mg/l). Todos os antagonistas bem como o extrato permaneceram em contato com o tecido por 15 minutos antes de iniciar a curva com a acetilcolina ou histamina. Os registros foram obtidos por meio de transdutores isométricos (modelo TRI 210 da Letica Scientific Instruments e F 1202 da CB Sciences, EUA), acoplados a um amplificador de sinais (Modelo ML 130, MacLab ADI Instruments, Austrália) conectados a um computador contendo um software específico de integração (Chart v 4.00, PowerLab/MacLab, ADI Instruments, Austrália).

3.13 Análise estatística.

Os dados foram representados como as médias \pm erro padrão das médias em um n=8 animais por grupo. As diferenças entre as médias foram determinadas através da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. Para as preparações de órgão isolado, a curva cumulativa concentração-resposta foi expressa como porcentagem (%)

de contração máxima evocada por Ach e resposta de relaxamento máximo produzido por histamina em uma contração evocada por cloreto de bário. A porcentagem de inibição foi obtida para cada experimento individualmente em relação ao valor do controle. A análise estatística foi realizada pelo teste t de Student.

As análises foram realizadas usando o Programa para *Windows*, *GraphPad Prism* versão 5.0 (*GraphPad Software*, San Diego, EUA). Um valor de P menor que 0,05 foi considerado significativo.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da atividade cicatrizante do extrato de *Arctium lappa* L. em úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético.

A administração oral do extrato etanólico da Bardana nas doses de 1, 3, 10 e 30 mg/kg, duas vezes ao dia, do segundo ao oitavo dia após a indução de úlceras por ácido acético 80%, promoveu uma cicatrização de 29,2%; 41,4%; 59,3% e 38,5%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle (média da área da lesão = $90,6 \pm 3,4 \text{ mm}^2$). O controle positivo deste ensaio, omeprazol (40 mg/kg, duas vezes ao dia, durante sete dias) também reduziu as úlceras gástricas induzidas por ácido acético em 35,5% (Fig.4A). Entretanto, animais tratados com EET 100 mg/kg e ácido ascórbico (250 mg/kg) não mostraram redução nas úlceras gástricas. O conteúdo total de muco gástrico no controle não lesado foi reduzido de $54,0 \pm 1,0$ para $42,1 \pm 2,2 \text{ } \mu\text{g}$ de Alcian Blue/g de tecido no controle lesado (Fig. 4B). Contudo, a administração oral do

omeprazol (40 mg/kg), mas não da dose efetiva do extrato (10 mg/kg) em reduzir a lesão gástrica, foi capaz de aumentar/restabelecer o conteúdo de muco.

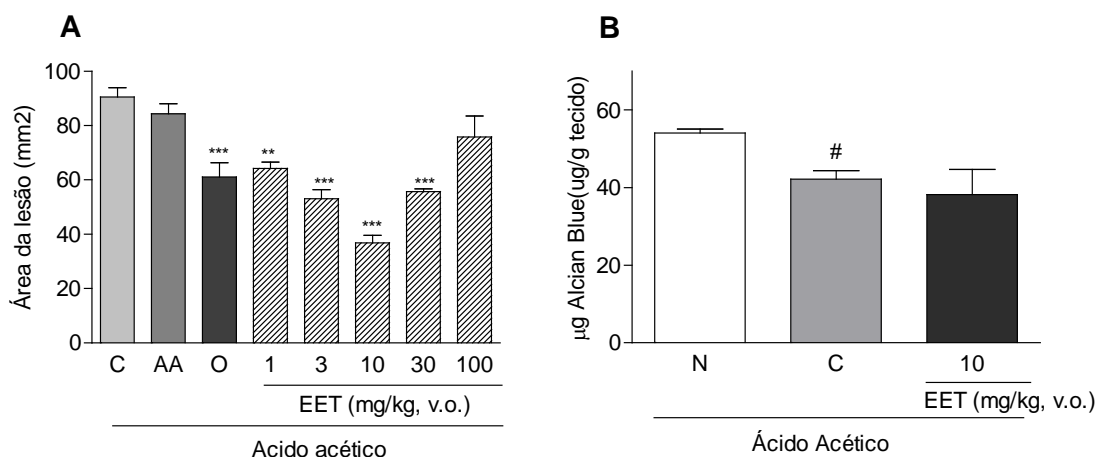


Figura 4. Efeito do extrato etanólico da Bardana nas úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (C: água, 0,1 ml/100 g), ácido ascórbico (AA: 250 mg/kg), omeprazol (O: 40 mg/kg) ou EET (1; 3; 10; 30 e 100 mg/kg) durante 7 dias, a partir do 2º dia após a indução da lesão gástrica. O painel A mostra os efeitos gastroprotetores do extrato EET e o painel B mostra o conteúdo de muco gástrico após a indução da lesão por ácido acético. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. ($n = 8$). A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ quando comparado com o grupo controle (C), # $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle não lesionado (N) .

A avaliação macroscópica da mucosa gástrica dos animais com úlceras crônicas revelou uma redução na área da lesão presente na mucosa gástrica dos animais tratados com omeprazol (40mg/kg; Fig. 5, Painel B) e com o extrato (10mg/kg; Fig. 5, Painel C), quando comparados com os animais controle (Fig. 5, Painel A). Corroborando com os dados macroscópicos, a avaliação histológica revelou que os animais tratados com omeprazol

(40mg/kg) e extrato (10mg/kg) apresentaram cicatrização parcial das úlceras, apresentando a base da úlcera coberta com tecido de regeneração, por vezes organizados em estruturas colunares acima do tecido de granulação (Painel E e F, respectivamente). Por outro lado, a avaliação histológica da mucosa gástrica dos animais com úlceras crônicas que foram tratados apenas com água (veículo) (Fig. 5, Painel D) revelou a presença de extensivo e profundo dano tecidual na mucosa gástrica.

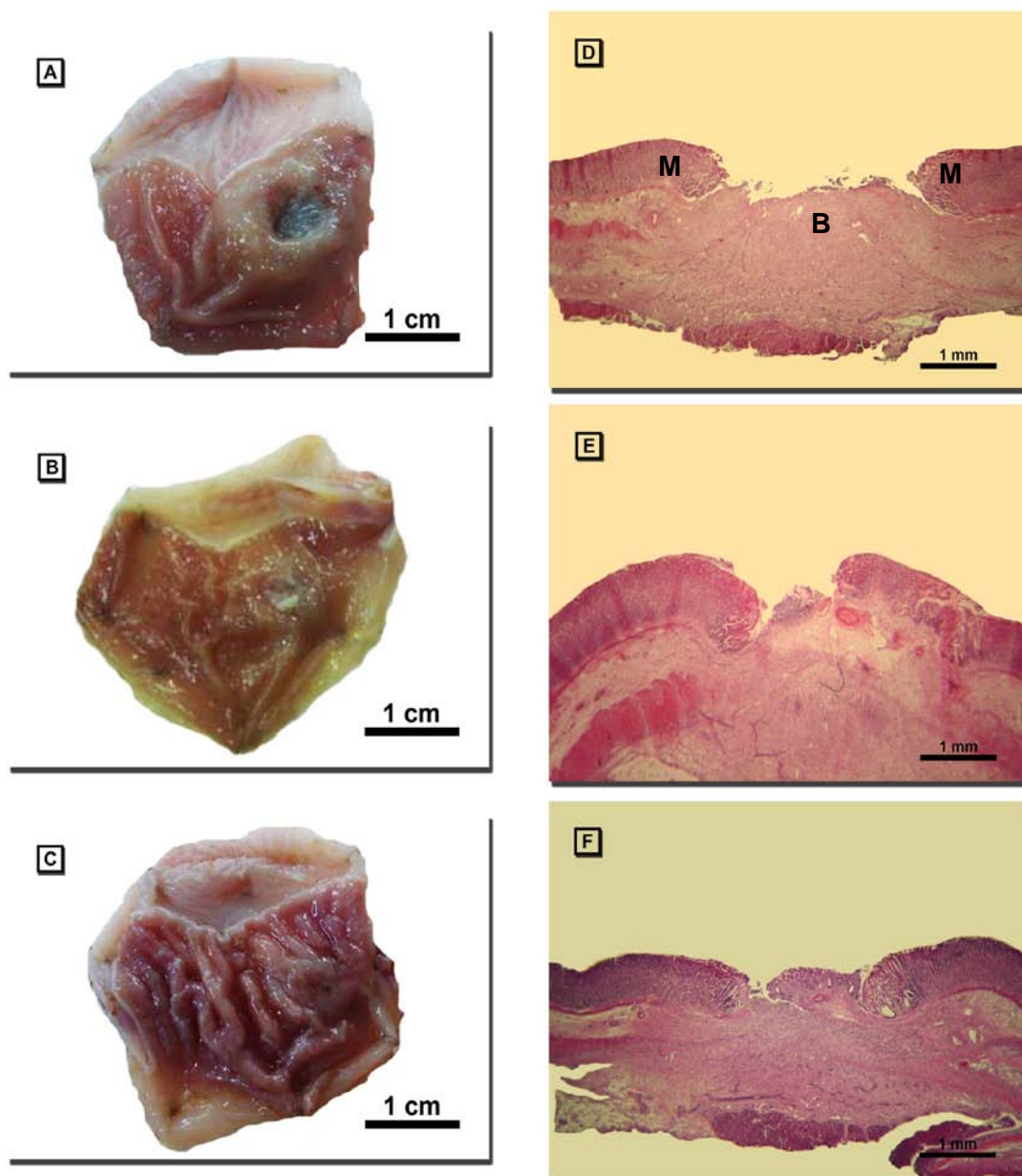


Figura 5. Análise macroscópica (painéis A, B e C) e microscópica (painéis D, E e F) das úlceras crônicas gástricas induzidas por ácido acético em ratos. Os animais foram tratados pela via oral com veículo (água - 0,1 ml/100 g; painel A e D), omeprazol (40 mg/kg; painel B e E) ou EET (10 mg/kg; painel C e F) durante 7 dias, a partir do 2º dia após a indução da lesão gástrica. M: região da margem da úlcera; B: região da borda da úlcera.

A imunohistoquímica para avaliar os níveis de proteína PCNA na mucosa gástrica ulcerada demonstrou significativa marcação para PCNA, nos animais que receberam o extrato etanólico de *Arctium lappa* (10 mg/kg) coloração visualizada em marrom (fig. 6 C), indicando aumento da proliferação celular nestes animais, sendo que este aumento foi de 123% em relação ao grupo controle tratado apenas com veículo (fig. 6 D). Por outro lado, animais tratados com omeprazol (40 mg/kg) não apresentaram aumento significativo da marcação para PCNA (fig. 6 B) quando comparados ao controle (fig. 6 A)

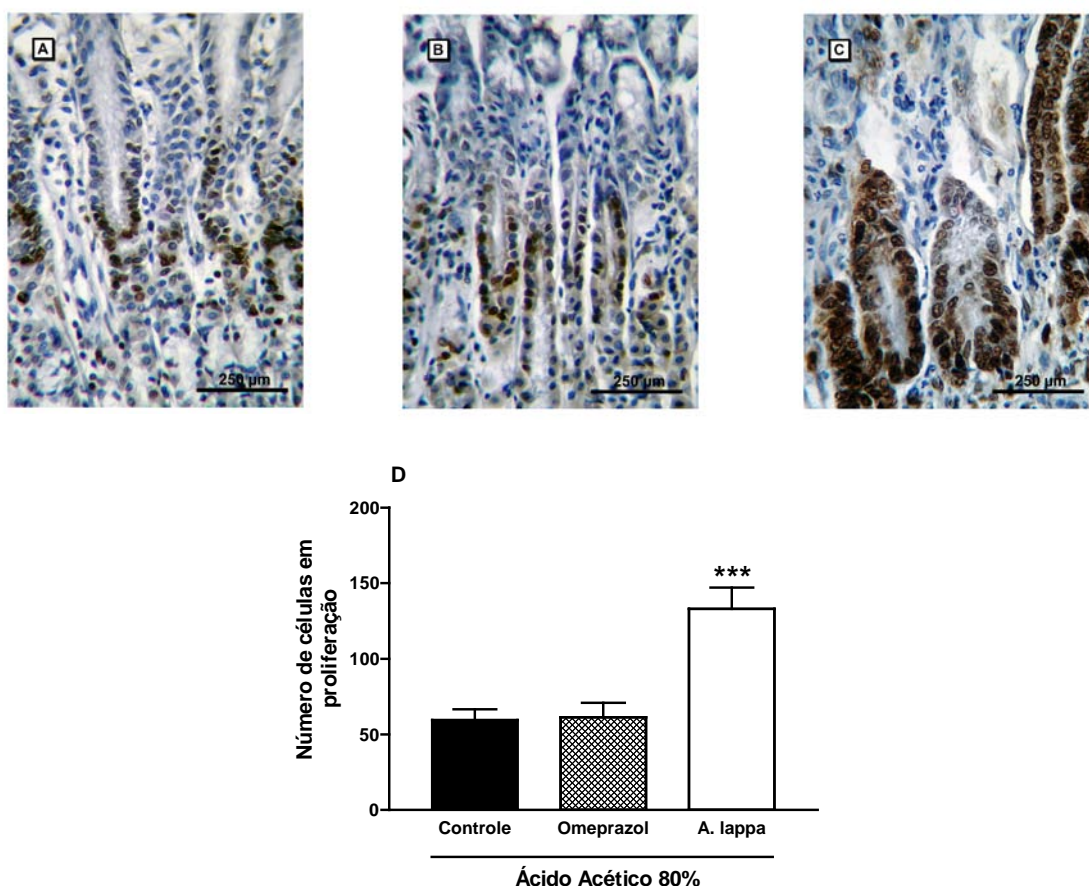


Figura 6. Efeito do EET (10 mg/kg, v.o.) na proliferação celular após a indução de úlceras gástricas crônicas. Marcação imunohistoquímica para PCNA na mucosa gástrica de animais tratados com veículo, omeprazol e o extrato: painéis A, B e C respectivamente. Quantificação da marcação imunohistoquímica: painel D. O número de células em proliferação foi expresso como média \pm E.P.M ($n = 8$). A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA de uma via) seguida do teste de Bonferroni. *** $P < 0,001$ quando comparado com o grupo controle (C). O: omeprazol.

A Figura 7 mostra o extravasamento do corante azul de Evans nos estômagos de ratos após a indução de úlcera gástrica por ácido acético, que avalia indiretamente a permeabilidade vascular na área lesada. Em estômagos não ulcerados (N de normal), a quantidade de corante extravasado foi de $0,47 \pm 0,05$ ug/g de tecido. Já em estômagos ulcerados tratados apenas com água (controle), a permeabilidade vascular foi significativamente aumentada para $1,56 \pm 0,12$ ug/g de tecido. Por outro lado, a administração diária do extrato (10 mg/kg) por 7 dias, duas vezes ao dia, iniciada no segundo dia após a lesão induzida por ácido acético, reduziu significativamente a permeabilidade vascular em 64,2% (Fig.7)

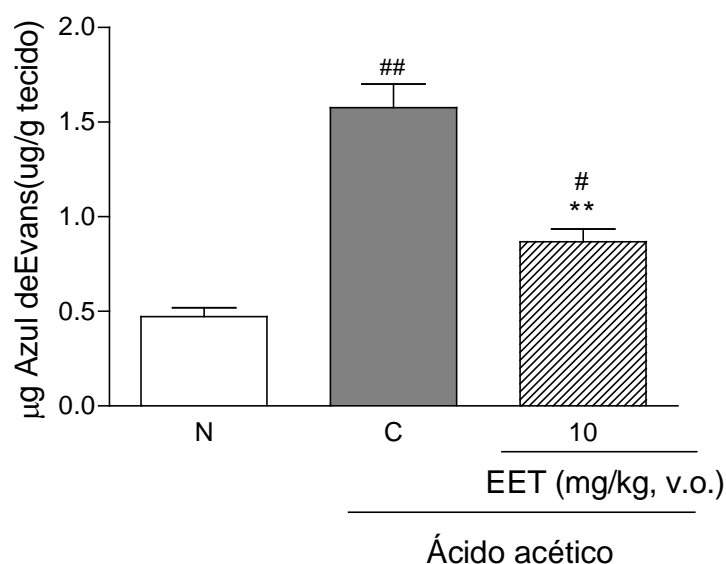


Figura 7. Efeito do EET (10 mg/kg, v.o.) na permeabilidade microvascular após a indução de úlceras gástricas crônicas. O extravasamento do corante azul de Evans foi expresso como média \pm E.P.M ($n = 8$). A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA de uma via) seguida do teste de Bonferroni. ##, $P < 0,001$ e # $P < 0,01$ quando comparado com o grupo normal (N) e ** $P < 0,001$ quando comparado com o grupo controle (C)

4.2 Efeito do extrato de *Arctium lappa* na atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglucosaminidase (NAG) nas úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético.

A migração de neutrófilos observada em estômagos com úlceras induzidas por ácido acético foi determinada indiretamente pela atividade de MPO. Assim, a atividade da MPO foi aumentada significativamente em 95% em animais com lesões gástricas induzidas por ácido acético, quando comparado aos níveis basais do grupo não lesado (Fig 8A). O tratamento dos animais com EET (10 mg/kg, v.o) significativamente impediu o aumento da atividade da MPO em 65,3%. Já os animais tratados com omeprazol não apresentaram redução significativa na atividade da MPO quando comparado com o grupo controle (Fig.8A).

A atividade da MPO foi aumentada em 95% no homogenato de estômagos ulcerados quando comparado com o controle não lesado. Contudo, quando este homogenato foi incubado com EET (0,3; 1; 10 e 30 µg/ml), a atividade da MPO não foi modificada (Fig. 8B).

A indução de úlcera gástrica crônica por ácido acético aumentou a atividade da NAG em 20,3% quando comparado com estômagos do grupo controle não-lesado ($0,12 \pm 0,006$ mO.D./g de tecido). O tratamento dos animais com EET (10 mg/kg, v.o.) restaurou os níveis basais da atividade da NAG (Fig 8C).

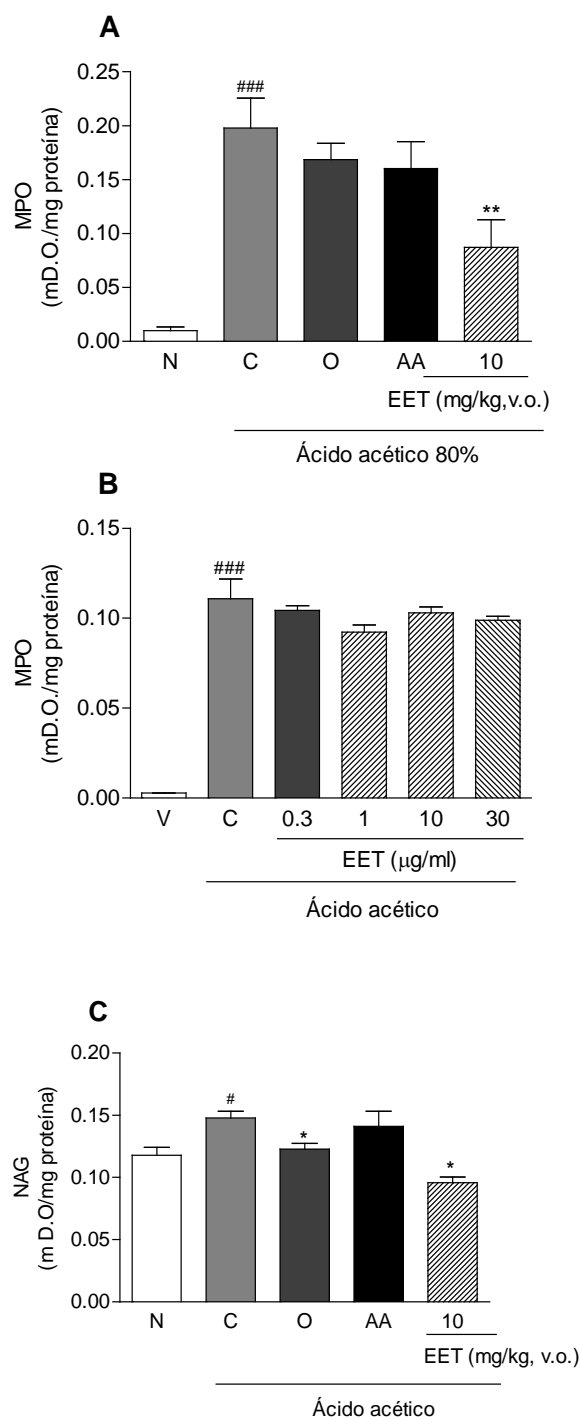


Figura 8. Efeito do EET (10 mg/kg, v.o.) sobre a atividade da MPO e NAG *Ex vivo* (painel A e C) e na atividade da MPO *in vitro* (painel B). Os resultados foram expressos por média \pm E.P.M ($n = 8$). A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA de uma via) seguida do teste de Bonferroni # $P < 0,05$; ### $P < 0,001$ quando comparado com o grupo normal (N) e * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ quando comparado com o grupo controle (C); AA: ácido ascórbico.

4.3 Efeitos do extrato *Arctium lappa* nos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio nas úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético.

A capacidade antioxidante do extrato foi observada através do ensaio da redução da atividade do radical DPPH. O extrato (3; 10; 30 e 100 µg/ml) foi capaz de reduzir em 23,5; 34,6; 56,1 e 67,2%, respectivamente, a atividade do DPPH quando comparado com as amostras do estômagos de animais que receberam apenas água ($0,24 \pm 0,01$ nM) (Fig. 9A). O controle positivo para este parâmetro foi o ácido ascórbico, que foi capaz de reduzir os níveis de DPPH em 67,2%.

Os resultados mostrados na Fig. 9B mostram que a exposição da mucosa gástrica ao ácido acético 80% aumentou os níveis de radicais livres em 105% quando comparado ao controle não lesado. O tratamento dos animais pela via oral com o extrato da Bardana (10 mg/kg) e ácido ascórbico (250 mg/kg) reduziu os níveis de radicais livres em 59 e 83,3%, respectivamente.

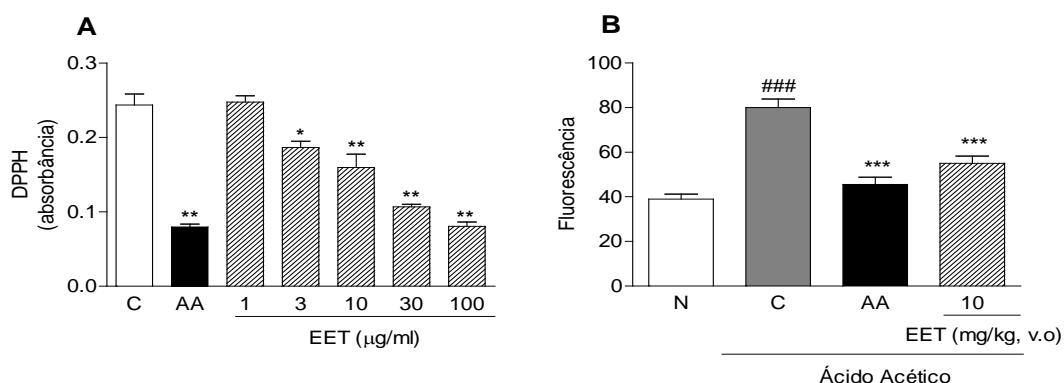


Figura 9. Efeitos do extrato etanólico da Bardana em diferentes concentrações (1, 3, 10, 30 e 100 µg/ml) nos níveis da atividade do radical DPPH (Painel A) e na dose de 10 mg/kg no conteúdo de radicais livres intracelulares (Painel B). média \pm E.P.M ($n = 8$). A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA de uma via) seguida do teste de Bonferroni. ### $P < 0,001$ quando comparado com o grupo normal (N) e * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ quando comparado com o grupo controle (C), AA: ácido ascórbico.

4.4 Efeitos do extrato de *Arctium lappa* no sistema antioxidante enzimático (SOD e CAT) e nos níveis de GSH e LOOH nas úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético.

A exposição da mucosa gástrica ao ácido acético 80% aumentou a atividade das enzimas SOD e CAT e diminuiu os níveis de GSH em 61,4; 86 e 98,6%, respectivamente quando comparado ao grupo controle não lesado (Tabela 1). O tratamento dos animais com EET (10 mg/kg, v.o.) restaurou a atividade da SOD e preveniu parcialmente a diminuição dos níveis de GSH para 60 e 57%, respectivamente, mas não afetou o aumento da atividade da CAT quando comparada aos animais ulcerados tratados apenas com água. O tratamento com omeprazol (40 mg/kg,v.o.) também restaurou a atividade da SOD e os níveis de GSH, além de aumentar a atividade da CAT. Já o tratamento com ácido ascórbico (250 mg/kg,v.o.) também foi capaz de restaurar os níveis de SOD em 47, 49% , prevenir em 17% os níveis de GSH, mas não afetou o aumento da atividade da CAT. A concentração de LOOH foi aumentada pela lesão com ácido acético em 89%. No entanto, o tratamento com o extrato (10 mg/kg, v.o.) mas não com omeprazol (40 mg/kg, v.o.) e nem com ácido ascórbico (250 mg/kg) reduziu os níveis de LOOH em 45,45% quando comparado com o grupo controle ulcerado e tratado apenas com veículo (água) (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito do tratamento oral com extrato (10 mg/kg), Omeprazol (O: 40 mg/kg) e Ácido ascórbico (AA: 250 mg/kg) na atividade das enzimas antioxidantes e nos níveis de GSH e LOOH nas úlceras gástricas induzidas por ácido acético.

	SOD (U/mg proteína)	CAT (μ mol/min/ mg proteína)	GSH (μ g/g tecido)	LOOH (mmol/mg proteína)
Normal	13,9 \pm 1,6	135,9 \pm 11,0	4265,0 \pm 202	1,5 \pm 0,9
Controle	35,9 \pm 3,4 ^{###}	960,1 \pm 73,6 ^{###}	58,1 \pm 5,7 ^{###}	13,6 \pm 1,0 ^{###}
Omeprazol	24,5 \pm 1,4 [*]	2245,0 \pm 177 [*]	2508,0 \pm 329,3 ^{***}	11,0 \pm 0,9
Ácido ascórbico	18,85 \pm 0,53 ^{**}	930,6 \pm 110	780,1 \pm 114,2 [*]	10,7 \pm 0,9
EET	22,9 \pm 2,1 ^{**}	616,5 \pm 59,5	1639,0 \pm 79,4 ^{***}	8,1 \pm 0,7 [*]

Os resultados foram expressos por média \pm E.P.M ($n = 8$). A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA de uma via) seguida do teste de Bonferroni. ^{*} $P < 0,05$, ^{**} $P < 0,01$ e ^{***} $P < 0,001$ quando comparado com o grupo controle. ^{###} $P < 0,001$ quando comparado com o grupo não lesionado (normal).

4.5 Efeito anti-secretor ácido do extrato etanólico de *Arctium lappa* L. em ratos.

✓ Efeitos do extrato sobre a secreção ácida gástrica basal.

A administração do extrato nas doses de 10 e 30 mg/kg pela via intraduodenal (i.d), após realização de ligadura pilórica, foi capaz de reduzir significativamente o volume do conteúdo gástrico em 49,8% e 43,5%; respectivamente. Já o tratamento com omeprazol (40 mg/kg v.o), utilizado como controle positivo para este teste, também foi capaz de diminuir o volume

da secreção gástrica em 44,8%, quando comparado aos animais do grupo controle tratados apenas com água ($6,02 \pm 0,51$ ml) (Fig. 10A).

A acidez da secreção gástrica também foi mensurada após ligadura pilórica, sendo que nos animais tratados apenas com água a acidez foi de 0,05 mEq[H⁺]. A administração de EET nas doses de 10 e 30 mg/kg (i.d.) e omeprazol (40 mg/kg v.o) foi capaz de diminuir em 64%; 76,7% e 92,8 %, os níveis de acidez da secreção gástrica, respectivamente.(Fig. 9 B). Entretanto, a administração de EET na dose de 100 mg/kg i.d., após realização de ligadura pilórica, não foi capaz de reduzir significativamente o volume e nem a acidez do conteúdo gástrico.

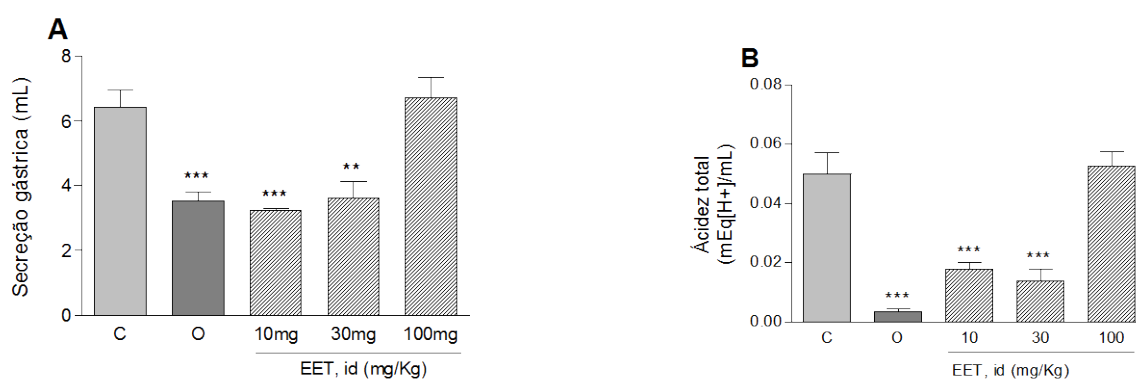


Figura 10. Efeito do extrato sobre o volume da secreção gástrica (painel A) e sobre a acidez da secreção gástrica (painel B) em ratos piloro-ligados. Os resultados foram expressos por média \pm E.P.M ($n = 8$). A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA de uma via) seguida do teste de Bonferroni ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ quando comparado com o grupo controle (C), O: omeprazol.

✓ Efeitos do extrato sobre a secreção ácida gástrica estimulada por betanecol, histamina e pentagastrina

A administração i.d de betanecol (2,5 mg/kg), histamina (20 mg/kg) e pentagastrina (0,4 mg/kg) aumentaram o volume da secreção ácida gástrica

basal de $5,1 \pm 0,1$ mL para $7,0 \pm 0,6$ mL, $6,4 \pm 0,4$ mL e $7,4 \pm 0,2$ mL, respectivamente. Atropina (1 mg/kg) e ranitidina (50 mg/kg) impediram o aumento do volume do conteúdo gástrico secretado por betanecol e histamina, respectivamente, alcançando valores de $3,3 \pm 0,1$ e $3,4 \pm 0,03$ mL, respectivamente.

A administração de EET (10 mg/kg, i.d.) impediu o aumento do volume da secreção ácida gástrica estimulada por betanecol ($3,5 \pm 0,19$ mL) e por histamina ($4,97 \pm 0,2$ mL), mas não por pentagastrina ($7,7 \pm 0,16$ mL). (Fig. 11 A, C e E).

Os secretagogos betanecol (2,5 mg/kg), histamina (20 mg/kg) e pentagastrina (0,4 mg/kg) foram capazes de aumentar a acidez da secreção gástrica basal em 75%, 50% e 40% quando comparados com os animais tratados com água ($0,04 \pm 0,004$ mEq[H⁺]/mL), respectivamente.

O aumento da acidez do conteúdo gástrico estimulado por betanecol e por histamina foi impedido pela administração subcutânea de atropina (1 mg/kg) e ranitidina (50 mg/kg), respectivamente, alcançando valores de $0,015 \pm 0,002$ e $0,01 \pm 0,001$ mEq[H⁺]/mL, respectivamente. O tratamento com EET (10 mg/kg i.d.) foi capaz de diminuir a acidez da secreção gástrica estimulada por betanecol ($0,017 \pm 0,002$ mEq[H⁺]/mL) e pela histamina ($0,04 \pm 0,002$ mEq[H⁺]/mL) mas não por pentagastrina ($0,08 \pm 0,003$ mEq[H⁺]/mL) (Fig. 11 B, D e F).

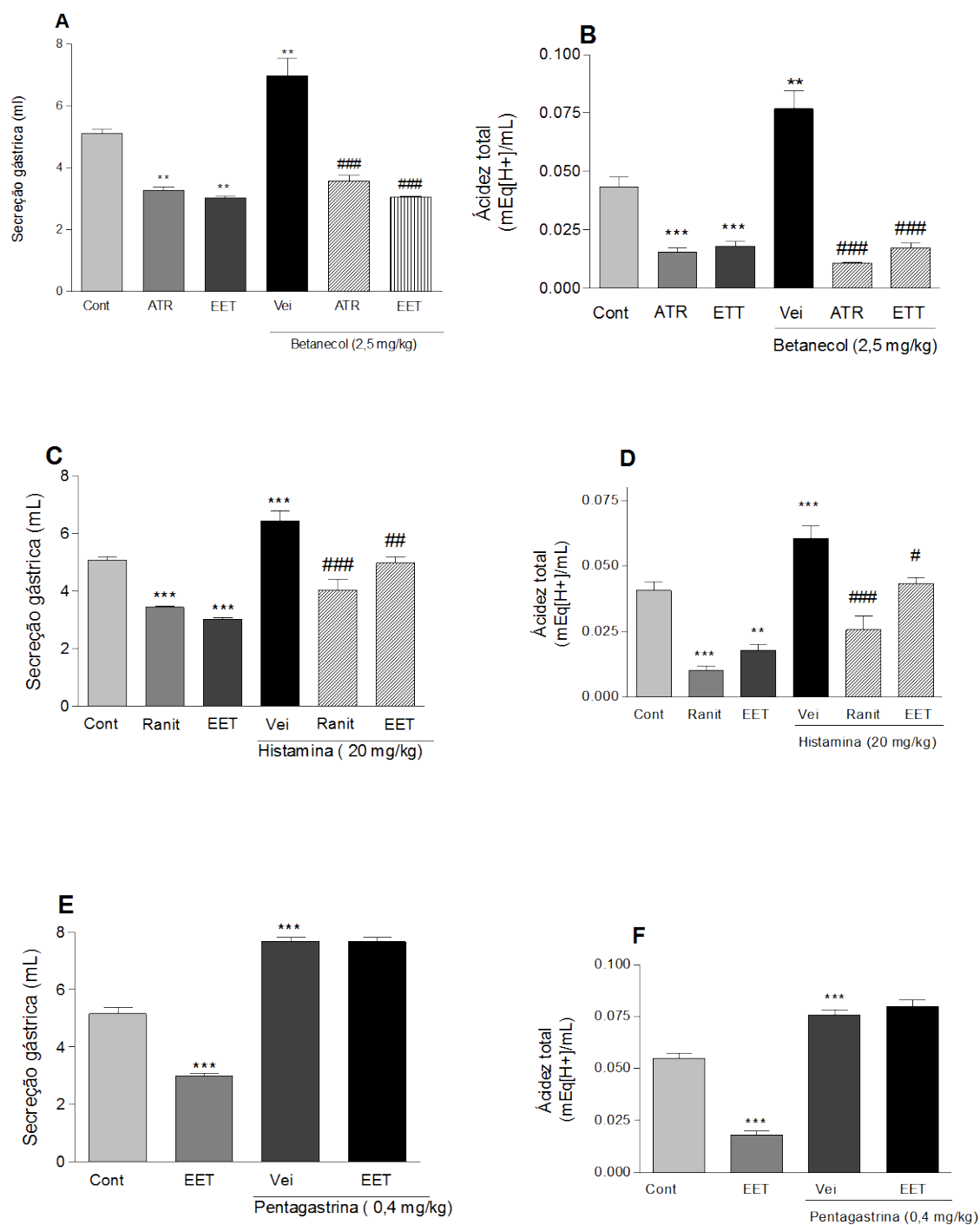


Figura 11. Efeito do extrato sobre a atividade secretagoga do betanecol, histamina e pentagastrina no volume (painel A, C, E, respectivamente) e na acidez da secreção gástrica (painel B, D, F, respectivamente). Os resultados foram expressos por média \pm E.P.M ($n = 8$). A comparação estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA de uma via) seguida do teste de Bonferroni $**P < 0,01$ e $***P < 0,001$ quando comparado com o grupo controle (Cont) e $\#P < 0,05$; $\##P < 0,01$; $###P < 0,001$ quando comparado com o grupo veículo (Vei), respectivamente.

4.6. Efeito do extrato no relaxamento induzido pela histamina no estômago isolado de rato.

Logo após uma contração induzida por cloreto de bário 0,03 M, uma curva cumulativa de relaxamento com histamina (10 nM a 10 μ M) nos segmentos teciduais foi realizada. Como esperado, nessas concentrações a histamina foi capaz de evocar um relaxamento tecidual. Este relaxamento foi abolido pela ranitidina ($7 \cdot 10^{-2}$ M), um antagonista do recetor histaminérgico do tipo 2 (H₂). No entanto, o extrato em diferentes concentrações (0,1; 0,3 e 1 mg/ml), não teve efeito sobre o relaxamento causado pela histamina em estômago isolado de rato (Fig 12).

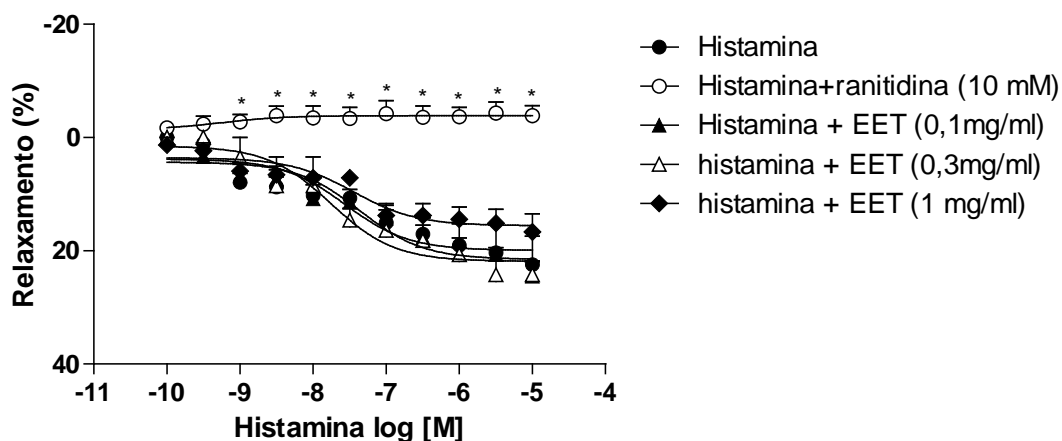


Figura 12. Efeito do EET (0,1; 0,3 e 1 mg/ml) sobre o relaxamento causado pela histamina (10 nM a 10 μ M) em segmentos da musculatura lisa circular de estômagos de rato. Cada ponto representa a média de seis experimentos e as linhas verticais indicam o E.P.M. *P<0,05; difere significativamente do controle (teste t de Student).

4.7. Efeito do extrato na contração induzida pela acetilcolina no estômago isolado de rato de rato.

A figura 13A exibe a curva cumulativa de contração de Ach na ausência e na presença de atropina (0,1 mM), um antagonista do receptor muscarínico. Como esperado, atropina causou inibição da contração induzida pela acetilcolina. Semelhantemente o extrato (0,1; 0,3 e 1 mg/ml), foi capaz de inibir de maneira concentração dependente o efeito contrátil causado pela acetilcolina (Fig. 13B).

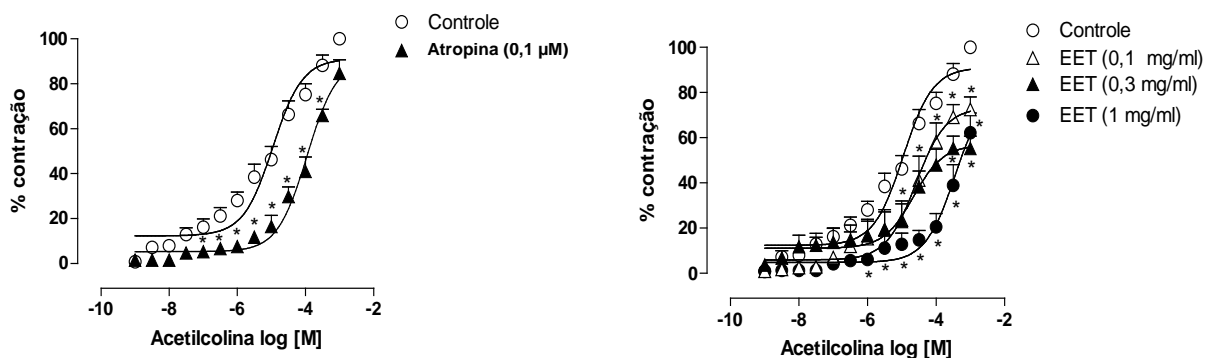


Figura 13. Efeito do EET (0,1; 0,3 e 1 mg/ml) sobre a contração induzida pela acetilcolina (1nM a 1 mM) em segmentos da musculatura lisa circular de estômagos de rato. Cada ponto representa a média de seis experimentos e as linhas verticais indicam o E.P.M. * $P < 0,01$ difere significativamente do controle (teste t de Student).

5. DISCUSSÃO

Estudos prévios do nosso grupo mostraram que os extratos clorofórmico e etanólico obtidos do pó das raízes da espécie vegetal *Arctium lappa* L., conhecida popularmente como Bardana, possui atividade gastroprotetora em úlceras gástricas agudas induzidas por etanol bem como nas crônicas causadas por ácido acético (MENDES, 2005; DOS SANTOS, 2009). No entanto, nesse estudo, apenas o mecanismo pelo qual o extrato clorofórmico atua foi esclarecido.

O efeito gastroprotetor observado com o extrato clorofórmico em estudos anteriores realizados em nosso laboratório parece ser devido, principalmente, a capacidade de inibir a atividade da bomba de prótons das células parietais de forma dependente da concentração, alcançando 73% de inibição com a concentração de 100µg/ml. Por outro lado, apesar de apresentar uma maior potência na cicatrização das lesões gástricas induzidas por ácido acético, o extrato etanólico (100 µg/ml) foi capaz de inibir a atividade da H⁺, K⁺ ATPase em apenas 9% (DOS SANTOS, 2007). Dessa forma, o presente estudo objetivou então investigar mecanismos de ação adicionais envolvidos no efeito gastroprotetor do extrato etanólico da *Arctium lappa* L. em úlceras crônicas induzidas por ácido acético 80% em ratos.

As úlceras produzidas por ácido acético são similares as úlceras crônicas humanas em termos de localização, severidade e cronicidade, bem como no que diz respeito ao processo de cicatrização (TAKAGI *et al.*, 1969). A lesão por ácido acético ocorre por alterações de múltiplos fatores incluindo alterações nos níveis de prostaglandinas, de fatores de crescimento, óxido

nítrico e citocinas, além de mudanças no padrão de aderência do muco e alterações na microcirculação (KOBAYASHI *et al.*, 2001). A cicatrização da úlcera também é um processo complexo, que envolve migração e proliferação celular, replicação de células epiteliais junto à margem da úlcera para restabelecer a arquitetura glandular e angiogênese no tecido de granulação na base da úlcera (TARNAWSKI, 2005).

Corroborando com os dados obtidos anteriormente por DOS SANTOS e colaboradores (2009), a extensão da lesão induzida por ácido acético foi significativamente reduzida pelo tratamento com o extrato etanólico de *Arctium lappa* L. com as doses de 10 e 30 mg/kg, mas não com a dose de 100 mg/kg. Como esperado, o omeprazol também foi capaz de inibir essas lesões gástricas. Os resultados *in vivo* foram confirmados pela análise histológica das lesões gástricas, a qual revelou a presença de úlceras penetrantes na parede da mucosa gástrica após a administração do ácido acético. Além disso, a análise histológica também confirmou a ação cicatrizante do extrato. De fato, os animais tratados com o extrato de *Arctium lappa* L, bem como com o omeprazol apresentaram significante regeneração da mucosa gástrica. Entretanto, apenas os animais tratados com o extrato de *Arctium lappa* L. apresentaram aumento na marcação imunohistoquímica para PCNA, sugerindo que a atividade cicatrizante do extrato, ao menos em parte, é mediada pelo aumento da proliferação celular.

O muco, que reveste continuamente a mucosa gástrica, desempenha um papel protetor contra agentes nocivos, como o ácido luminal e bactérias (CHEN *et al.*, 2005). Considerando que o extrato etanólico de *Arctium Lappa* L. diminuiu as lesões gástricas induzida por ácido acético, nós mensuramos o

nível de muco gástrico com o intuito de verificar o envolvimento desse fator de proteção no efeito gastroprotetor do extrato. Porém, em nossos experimentos o nível de muco gástrico não foi alterado pelo tratamento com o extrato, o que indica que o mecanismo de proteção da *Arctium lappa* L. contra a lesão gástrica induzida por ácido acético parece não envolver este importante mecanismo de citoproteção.

Dando continuidade aos experimentos, nós verificamos se o efeito gastroprotetor do extrato estaria relacionado com alguma alteração no processo inflamatório gástrico causado pela exposição ao ácido acético. Na evolução do modelo de úlcera gástrica experimental, a resposta inflamatória é de grande importância e promove várias alterações e mudanças associadas com um infiltrado inflamatório celular (OKABE *et al.*, 2005). Agentes quimiotáticos induzem a migração de neutrófilos no espaço intersticial, que promovem a liberação de espécies reativas derivadas do oxigênio e proteases, resultando em um dano tecidual inflamatório dependente de neutrófilos (HUBER e WEISS, 1989). A atividade da MPO é um marcador indireto da resposta inflamatória em uma variedade de modelos experimentais, sendo um indicador essencial da atividade neutrofílica (BRADLEY *et al.*, 1982), enquanto a NAG é uma enzima lisossômica produzida por monócitos ativados e usada como um indicador da infiltração dessas células no sítio inflamatório (BAILEY, 1988). Em nossos experimentos observamos um aumento na atividade das enzimas MPO e NAG nas úlceras crônicas gástricas induzidas por ácido acético, sugerindo a ocorrência de um infiltrado de neutrófilos e macrófagos no local da lesão. Todavia, nas amostras teciduais de ratos tratados com o extrato, pudemos observar uma significativa diminuição na atividade dessas enzimas.

Contudo, quando os tecidos ulcerados foram diretamente incubados com diferentes concentrações do extrato, não foram observadas alterações nos níveis da atividade da MPO. Esses resultados sugerem que o extrato de *Arctium lappa* L; pode contribuir para a diminuição do processo inflamatório causado pelo ácido acético, atenuando o dano da mucosa gástrica produzido por uma reação inflamatória mediada por leucócitos, mas provavelmente não inibe diretamente a atividade enzimática da MPO. Dados da literatura, demonstram que durante o processo inflamatório ocorrem mudanças na permeabilidade capilar (KVIETYS e GRANGER, 1993), contribuindo para o aumento da permeabilidade microvascular e conseqüentemente extravasamento de proteínas plasmáticas. Em adição, o aumento da permeabilidade vascular também pode ser evidenciado durante o desenvolvimento da ulcera crônica induzida por ácido acético em ratos (MOTILVA *et al.*, 1996).

Reforçando os dados obtidos por Motilva e colaboradores (1996), nós também observamos um significativo aumento da permeabilidade vascular em mucosas gástricas ulceradas. Interessantemente, a administração oral diária do extrato por sete dias reduziu a permeabilidade microvascular; contribuindo para a hipótese de que *Arctium lappa* L poderia estar promovendo a diminuição do processo inflamatório induzido pelo ácido acético.

De acordo com dados da literatura, neutrófilos são uma importante fonte de radicais livres endógenos durante o processo inflamatório (MOTILVA *et al.*, 1996, McCORD *et al.*, 1994, DEMIR *et al.*, 2003). Espécies reativas como radical hidroxila (OH^\cdot), radical superóxido (O_2^\cdot) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), gerados pelo NADPH oxidoredutase em neutrófilos ativos induzem

constantemente o dano oxidativo nos tecidos e são associados com a peroxidação lipídica (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Os antioxidantes protegem os sistemas biológicos contra a ação danosa de radicais livres e outros mediadores envolvidos na peroxidação lipídica, protegendo o corpo humano de várias doenças. Vários antioxidantes fenólicos como flavonóides, taninos, cumarinas e xantinas sequestram radicais de maneira dependente da dose e, portanto, são vistos como promissoras drogas terapêuticas para as patologias envolvidas com danos oxidativos (CZINNER *et al.*, 2001). Espécies reativas derivadas do oxigênio possuem um importante papel na patogênese da lesão no sistema digestivo, de fato, o envolvimento de espécies reativas como OH^\cdot , O_2^\cdot e H_2O_2 , já é bem estabelecido na patogênese de úlceras gástricas agudas induzida por isquemia e reperfusão (Simith *et al.*, 1996), AINEs (JAVOR *et al.*, 1986), etanol (GAZZIERI *et al.*, 2007) e estresse (YELKEN *et al.*, 1999). Sendo assim, alguns estudos apontam a gastroproteção de antioxidantes como o ácido ascórbico (KOC *et al.*, 2008; KAMIJI e OLIVEIRA, 2005), n-acetilcisteína (BARRETO *et al.*, 1993), e ácido lipóico (SEHIRLI *et al.*, 2008) em alguns modelos agudos de úlcera gástrica.

Dada a importância dos sistemas antioxidantes no restabelecimento da homeostasia da mucosa gástrica e objetivando melhor compreender os mecanismos pelos quais *Arctium lappa* L promove a melhora das úlceras crônicas induzidas por ácido acético, nós decidimos avaliar a capacidade antioxidante do extrato e as possíveis alterações promovidas nos sistemas antioxidantes.

Primeiramente, através de um ensaio *in vitro*, demonstramos que tanto o extrato como o ácido ascórbico reduzem o radical DPPH e conseqüentemente diminuem a atividade deste radical livre, quando comparado ao grupo controle (água); sugerindo que ambos possuam atividade seqüestradora de radicais livres, pelo menos *in vitro*.

A produção intracelular de radicais livres pode ser investigada usando 2',7'-diclorfluoresceína-diacetato (DCFH-DA), um método bem estabelecido para detectar e quantificar espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (DONG *et al.*, 2008). De fato, em nossos experimentos utilizando (DCFH-DA), um significativo aumento nos níveis de radicais livres intracelulares na mucosa gástrica ulcerada foi observado; por outro lado, o tratamento com o extrato e com o ácido ascórbico foi capaz de diminuir a geração de radicais livres intracelulares no sítio da lesão. No entanto, somente o extrato foi capaz de inibir a extensão da lesão gástrica.

Além das alterações no metabolismo celular, os radicais livres também promovem dano tecidual através da hidroperoxidação de lipídios da membrana plasmática, que resulta na liberação de componentes intracelulares, tais como enzimas lisossomais (Demir *et al.*, 2003). Na mucosa gástrica, essa hidroperoxidação lipídica contribui para o desenvolvimento da lesão (DEMIR *et al.*, 2003). De fato, em nossos experimentos, a hidroperoxidação lipídica se encontrava aumentada nos animais ulcerados tratados apenas com veículo; contudo, ratos tratados com o extrato apresentaram uma significativa diminuição nos níveis de hidroperoxidação, o que poderia estar contribuindo para a atenuação do dano tecidual. Todavia, úlceras oriundas de animais

tratados com ácido ascórbico conservaram elevados níveis de hidroperoxidação lipídica.

GSH é encontrada em altas concentrações na mucosa gástrica de ratos e de humanos (BODY *et al.*, 1979), constituindo um importante mecanismo citoprotetor (CNUBBEN *et al.*, 2001). Efetivamente, GSH participa diretamente como um potente antioxidante e indiretamente como substrato para várias outras enzimas antioxidantes, tais como: glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR) (CNUBBEN *et al.*, 2001). Nossos resultados mostraram que há uma diminuição nos níveis de GSH após a exposição da mucosa gástrica ao ácido acético, uma vez que o extrato de *Arctium lappa*, L., na dose mais efetiva para cicatrização das úlceras, foi capaz de prevenir parcialmente essa diminuição, porém o ácido ascórbico não.

Muitos sistemas de enzimas antioxidantes têm sido reconhecidos na patogênese das úlceras gástricas, incluindo SOD, CAT, GST, GPx e GR. Altas concentrações do ânion superóxido (O_2^-) pode ativar a enzima superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), formando espécies menos reativas. O H_2O_2 é então inativado pela CAT e GPx degradando-se em água (Kwiecien *et al.* 2002). Nossos resultados demonstram um aumento na atividade de CAT e SOD, sugerindo alterações nas concentrações de (O_2^-) e H_2O_2 nas lesões gástricas induzidas por ácido acético. A administração do extrato restaurou os níveis basais da atividade enzimática de SOD, porém os níveis da atividade de CAT não foram restabelecidos. Apesar do tratamento com ácido ascórbico não ter sido efetivo na diminuição das lesões gástricas crônicas induzidas por ácido

acético, foi capaz de restaurar parcialmente os níveis de SOD e GSH, mas não de CAT após a lesão gástrica.

Com os dados obtidos acima, podemos concluir parcialmente que apesar da presença de flavonóides como quercetina ramnosídeo e luteolina nas raízes de *Arctium lappa* L. (FERRACANE *et al.*, 2010), associado as possíveis atividades antioxidante e sequestradora de radicais livres; o efeito gastroprotetor de *Arctium lappa* L. não parece ser devido, ao menos principalmente, à uma atividade antioxidante. Visto que, antioxidantes teriam alguma atividade gastroprotetora em úlceras agudas induzidas por etanol ou AINES (KOC *et al.*, 2008; KAMIJI e OLIVEIRA, 2005; BARRETO *et al.*, 1993; SEHIRLI *et al.*, 2008), nossos resultados sugerem que os mecanismos envolvidos no efeito ulcerogênico observado nos modelos agudos parecem diferir daqueles envolvidos no modelo crônico induzido pelo ácido acético.

Dando continuidade aos nossos experimentos para elucidar o mecanismo gastroprotetor de *Arctium lappa* L., resolvemos investigar a ação do extrato sobre a secreção ácida gástrica; embora estudos anteriores com o extrato demonstrassem apenas uma pequena capacidade de inibição na atividade da H^+ , K^+ ATPase. A atividade do extrato sobre a secreção ácida gástrica foi avaliada utilizando um modelo *in vivo*, por intermédio de ligadura pilórica. Os nossos experimentos demonstraram que de forma interessante as doses efetivas na diminuição da extensão da úlcera crônica gástrica induzida por ácido acético, também foram capazes de reduzir o volume e a acidez gástrica. Já é bem conhecido que o aumento da secreção ácida gástrica constitui um importante agente etiológico das úlceras e juntamente com as

enzimas proteolíticas secretadas no estômago, contribuem para o aparecimento e desenvolvimento de lesões na mucosa gástrica.

A H^+ , K^+ ATPase presente nas células parietais é uma enzima responsável pelo transporte de prótons de fluidos intracelulares para o lúmen gástrico (CAPLAN, 2007). A atividade fisiológica desta enzima está sujeita à modulação (estimulação e inibição) por sinais moleculares neuronais e endócrinos, como acetilcolina, gastrina, histamina e somatostatina (Sachs e Shin 1995). Apesar do extrato inibir diretamente de forma muito discreta a atividade da H^+ , K^+ ATPase, a diminuição da secreção ácida gástrica produzida por *Arctium lappa* L. poderia estar relacionada à alterações nos estímulos secretagogos da célula parietal. De fato, nossos resultados demonstraram que o extrato de *Arctium lappa* L. inibiu significativamente a secreção ácida gástrica estimulada por betanecol. Por outro lado, a secreção ácida gástrica estimulada por histamina, mas não por pentagastrina, foi parcialmente inibida.

Estes resultados sugerem que o extrato de *Arctium lappa* L. diminui a secreção ácida gástrica, provavelmente, por interferir na estimulação colinérgica ou histaminérgica das células parietais.

Esses dados nos levaram a investigar se a inibição de receptores colinérgicos e/ou histaminérgicos estariam envolvidos no efeito gastroprotetor de *Arctium lappa* L. Nossos experimentos com estômago isolado indicaram que o extrato inibe significativamente a contração de segmentos teciduais do fundo gástrico de ratos provocada por ACh de maneira dependente da concentração, deslocando a curva sigmóide concentração-resposta para a direita e diminuindo a contração máxima provocada pelo agonista. Dessa forma, esses resultados sugerem que o extrato de *Arctium lappa* L. possui princípios ativos que

funcionam como antagonistas não competitivos dos receptores muscarínicos gástricos. Esse último dado sustenta a hipótese de que o extrato diminui a secreção ácida gástrica por reduzir o estímulo secretagogo muscarínico nas células parietais.

Para verificar a possibilidade do envolvimento dos receptores H_2 no efeito gastroprotetor de *Arctium lappa* L. , experimentos com estômago isolado também foram efetuados. Tanto os receptores H_1 como os receptores H_2 estão envolvidos na manutenção do tônus da musculatura lisa gástrica (MILENOV *et al.*, 1995). MULLER e colaboradores (1993) atentaram para o efeito dual da histamina na estimulação da musculatura gástrica; ou seja, em concentrações inferiores a 10 μ M, a histamina produz relaxamento *in vitro* enquanto que em concentrações superiores a esse valor a histamina promove a contração tecidual. Esses autores relataram que os receptores H_2 estariam envolvidos no relaxamento, enquanto que receptores H_1 seriam responsáveis pela contração induzida pela histamina. Em nossos experimentos, realizamos a pré-contração da musculatura do estômago com cloreto de bário para melhor examinar o relaxamento e conseqüentemente o efeito da histamina sobre receptores H_2 . De fato, observamos que a histamina foi capaz de produzir um relaxamento parcial em concentrações inferiores a 10 μ M, e que a ranitidina (um antagonista competitivo dos receptores H_2) inibiu esse relaxamento. Entretanto, a incubação dos segmentos teciduais com o extrato não produziu nenhuma alteração no relaxamento induzido por histamina. Esses resultados sugerem que o efeito gastroprotetor de *Arctium lappa* L. não esteja relacionado, pelo menos diretamente, a um bloqueio da estimulação histaminérgica gástrica. O efeito inibitório, *in vivo*, da secreção ácida gástrica estimulada por histamina

apresentado pelo extrato de *Arctium lappa* L. seja, provavelmente, em decorrência da capacidade do extrato em diminuir a estimulação colinérgica na liberação de histamina pelas células ECL, uma vez que receptores muscarínicos do tipo 1 (M₁) estariam presentes nesse tipo celular mediando o efeito estimulatório da acetilcolina na secreção de histamina.

Em conclusão, o efeito gastroprotetor do extrato de *Arctium lappa* L parece envolver a redução da secreção ácida gástrica, possivelmente pela inibição dos receptores muscarínicos gástricos, o que promoveria uma melhora no processo inflamatório da lesão gástrica, com redução da permeabilidade vascular e migração leucocitária; restabelecendo, conseqüentemente, o sistema antioxidante. Porém não podemos excluir a possibilidade de outros fatores envolvidos no amplo processo de gastroproteção. É interessante ressaltarmos que alguns autores indicam que compostos presentes nas raízes de *Arctium lappa* L., como, por exemplo, a arctigenina, inibe a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α e IL-6 (CHO *et al.*,2004) . Este composto também seria capaz de inibir fortemente a expressão e a atividade enzimática da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), sem alterar a expressão e a atividade enzimática da ciclooxigenase do tipo 2 (COX-2) (ZHAO *et al.*,2009). Assim, os mecanismos precisos pelos quais o extrato promove seu efeito gastropotetor ainda não estão totalmente esclarecidos, sendo que estudos adicionais deverão ser realizados, a fim de melhor esclarecer as vias pelas quais ele exerce esse efeito.

6. REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase. **Methods Enzymol**, v.105, p. 121–126, 1984.

ABITOL, R. A. **Doença ulcerosa péptica**. In: Medstudents: Rotinas de Clínica Médica. Disponível em <http://www.medstudents.com.br/rotinas/clinmed/dup.htm>. Acesso em 17/08/09.

ALVAREZ, A.; IBIZA, M.S.; HERNANDEZ, C.; ALVAREZ-BARRIENTOS, A.; ESPLUGUES, J.V.; CALATAYUDE, S. Gastrin induces leukocyte-endothelial cell interactions *in vivo* and contributes to the inflammation caused by *Helicobacter pylori*. **The FASEB Journal**. v.20, p.1742-1752, 2006.

ALVAREZ, A.; IBIZA, S.; ANDRADE, M.M.; BLAS-GARCÍA, ANA.; CALATAYUD, S. Gastric antisecretory drugs induce leukocyte-endothelial cell interactions through gastrin release and activation of cck-2 receptors. **JPET**, v.10, n.1124, p.1-32, 2007.

ARENDI, A.; LOIME, L.; ROOSAAR, P.; SOOM, M.; LÕIVUKENE, K.; SEPP, E.; AUNAPUU, M.; ZILMER, K.; SELSTAM, G.; ZILMER, M. Helicobacter pylori substantially increases oxidative stress in indomethacin exposed rat gastric mucosa. **Medicina (Kaunas)**. v.41, n. 4, 2005.

ATAY, S.; TARNAWSKI, A.S.; DUBOIS, A. Eicosanoids and stomach. **Prostaglandins & Others Lipids Mediators**. v.61, n.3-4, p.105-124, 2000.

BARROS, D. **Fitomedicamentos na indústria brasileira**. Phytomédica, ano 1, v.1. Disponível no endereço: http://www.ache.com.br/arquivo/institucional/phytomedica_jornal/numero5.pdf. Acesso em 17/08/09.

BAILEY, P.J. Sponge implants as models. **Methodology in immunology**. v.162, p. 327-334, 1988.

BARRETO, J.C.; SMITH, G.S.; TORNWALL, M.S.; MILLER, T.A. Protective action of oral N-acetylcysteine against gastric injury: role of hypertonic sodium. **Am J Physiol.**, v.264, p. G422-426, 1993.

BAYR, H. Reactive oxygen species. **Crit Care Med**. v.33, n.12, p.498-501, 2005.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. **Fisiologia: 5ª Edição**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

BLOIS, M.S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, p. 1199 – 1200, 1958.

BODY, S.C.; SASAME, H.A.; BODY, M.R. High concentrations of glutathione in glandular stomach: possible implications for carcinogenesis. **Science.**, v. 205, n. 4410, p.1010-1012, 1979.

BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal Investigative of Dermatology.**, v.78, p. 206-209, 1982.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11^a Edição. United States of America: Mc Graw-Hill Companies, Inc., 2006.

BRZOZOWSKI, T. Experimental production of peptic ulcer, gastric damage and câncer models and their use in pathophysiological studies and pharmacological treatment – polish achievements. **Journal of physiology and pharmacology**. v.54., p.99-126, 2003.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Cienc. Cult.**, v.55, n.3, p.37-39, 2003.

CALIXTO, J. B. Estudo farmacológico pré-clínico de plantas medicinais. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. 1 ed. Chapecó: Argos,2001.

CAPLAN, M.J. The Future of the pump. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 41, n.2, p. S217-S222, 2007.

CASTRO, J.L. **Medicina Vegetal**, 2 ed. Publicações Europa-América, p. 134-135, 1981.

CHANDE, N.S.L.; BUDINGER, G.R.S. Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation. **Free Radical Biology & Medicine**, v.42, p. 165-174, 2007.

CHEN, F. A.; WU, A. B.; CHEN, C. Y. The influence of treatments on the free radical scavenging activity of burdock and variations of its active. **Food Chemistry**, v. 86, p. 479-484, 2004.

CHEN, S.H. LIANG, Y.C., CHAO, J.C., TSAI, L.H., CHANG, C.C., WANG, C.C., PAN, S. Protective effects of Ginkgo biloba extract on the ethanol-induced gastric ulcer in rats. **World J. Gastroenterol.** v.11, p.3746-3750, 2005.

CHO, M. K.; JANG, Y. P.; KIM, Y. C.; KIM, S. G. Arctigenin, a phenylpropanoid dibenzylbutyrolactone lignan, inhibits MAP kinases and AP-1 activation via potent MKK inhibition: the role in TNF- α inhibition. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 1419-1429, 2004.

CNUBBEN, N. H. P., RIETJENS, I. M. C. M., WORTELBOER, H., van ZANDEN, J. & van BLADEREN, P. J. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.10, p.141-152, 2001.

CORNNER, S.J., MORRISSEY, S.M., WOODS, R.J. 1974. Proceedings: A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. **J. Physiol.**, v.242, p.116-117.

CORRÊA JÚNIOR, C.; SCHEFFER, M. C. Produção de plantas medicinais, condimentares e aromáticas no Estado do Paraná. In: CORREA JR, C.; GRAÇA, L.R.; SCHEFFER, M.C. **Complexo Agroindustrial das Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares no Estado do Paraná – Diagnóstico e Perspectiva**. 1 ed. Curitiba: EMATER, 2004.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis no Brasil**. Ministério da Agricultura: Instituto de Desenvolvimento Florestal, v.1, p. 269, 1984.

COSTA, M. **Identificação e farmacologia geral da substância tóxica isolada da *Arctium lappa* L. (Asteraceae)**. São Paulo, 1991, Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Neurotransmissores, Departamento de Farmacologia, Escola Paulista de Medicina.

CUNHA, A.P.; SILVA, A.P.; ROQUE, O.R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. 1 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.

CUZZOCREA, S. Protective effects of a new stable, highly active SOD mimetic, M40401 in splanchnic artery occlusion and reperfusion. **Br. J. Pharmacol.**, v.132, p. 19-29, 2001.

CZINNER, E., HAGYMÁSI, K., BLÁZOVICS, A., KÉRY, A., SZOKE, E., LEMBERKOVICS, E.. The in vitro effect of Helichrysi flos on microsomal lipid peroxidation. **J. Ethnopharmacol.**, v.77, p.31-35, 2001.

DEMİR, S.; YILMAZ, M.; KÖSEOĞLU, M.; AKALIN, N.; ASLAN, D.; AYDIN, AS. Role of free radicals in peptic ulcer and gastritis. **Turk J Gastroenterol.** v.14, n.1, p. 39-43, 2003.

DONG, W.; XIE, T.; DONG, J.Y.; JIN, S.W.; HUA, L.N.; SONG, F.; QING, C.; LU, S.L. Effects of the advanced glycosylation end products on the biological behavior of neutrophil. **Chinese.** v.24, n.1, p.9-12, 2008.

DOMER, F.R. **Animail experiments in pharmacological analysis.** Charles C. Thomas Publisher, p. 669, 1971.

DONG, M.H.; KAUNITZ, J.D. Gastroduodenal mucosal defense. **Current Opinion in Gastroenterology.** v.22., n.6, p.599-606, 2006.

DOS SANTOS, A.C; BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; LEPIESZYNSKI, J.; MAYER, B.; TWARDOWSCHY, A.; MISSAU, F.C.; DOS SANTOS, E.P.; PIZZOLATTI, M.G; MARQUES, M.C. Gastroprotective activity of the chloroform extract of the roots from *Arctium lappa* L. **J Ethnopharmacol.** v.21, p. 318-23, 2009.

EICH, E.; PERTZ, H.; KALOGA, M.; SCHULZ, J.; FESEN, M.R.; MAZUMDER, A.; POMMIER, Y.(-)-Arctigenin as a lead structure for inhibitors of human immunodeficiency virus type-1 integrase. **J Med Chem.**, v. 39, n. 1, p. 86-95, 1996.

FERRACANE, R.; GRAZIANI, G; GALLO, M.; FOGLIANO, V.; RITIANE, A. Metabolic profile of the bioactive compounds of burdock (*Arctium lappa* L.) seeds, root and leaves. **J. Pharm. Biomed.** v.51, p. 175-181, 2010.

FLEMSTRÖM, G; HÄLLGREN, A; NYLANDER, O.; ENGSTRAND, L.; WILANDER, E.; ALLEN, A. Adherent surface mucus gel restrict diffusion of macromolecules in rat duodenum in vivo. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v.227, p. G375 – G382, 1999.

FONT QUER, P. **Plantas medicinales. El Discórides renovado.** 11 ed. Barcelona: Labor S.A., 1988.

FORNAI, M.; NATALE, G; COLUCCI, R.; TUCCORI, M.; CARAZZINA, G.; ANTONIOLI, L.; BALDI, S.; LUBRANO, V.; ABRAMO, A.; BLANDIZZI, C.; DEL TACCA, M. Mechanisms of protection by pantoprazole against NSAID-induced gastric mucosal damage. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 372, p. 79–87, 2005.

GANOG, W.F. **Review of medical physiology**. 21 ed. San Francisco: Lange Medical Books, 2003.

GAZZIERI, D.; TREVISANI, M.; SPRINGER, J.; HARRISON, S.; COTTRELL, G.S.; ANDRE, E.; NICOLETTI, P.; MASSI, D.; ZECCHI, S.; NOSI, D.; SANTUCCI, M.; GERARD, N.P.; LUCATTELLI, M.; LUNGARELLA, G.; FISCHER, A.; GRADY, E.F.; BUNNETT, N.W.; GEPPETTI, P. Substance P released by TRPV1-expressing neurons produces reactive oxygen species that mediate ethanol-induced gastric injury. **Free Radic Biol Med**. v.15, n. 4, p. 581-589, 2007.

GENTIL, M.; PEREIRA, J.V.; SOUSA, Y.T.C.S.; PIETRO, R.; NETO, M.D.S.; VANSAN, L.P.; FRANÇA, S.C. In vitro evaluation of the antibacterial activity of *Arctium lappa* as a phytotherapeutic agent used in intracanal dressings. **Phytother.Res.** v.20, p.184-186, 2006.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 3 rd ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HOOGERWERF, W.; PASRICHA, P.J. Agentes usados para o controle da acidz gástrica e no tratamento de úlceras pépticas e da doença do refluxo gastroesofágico. In: **Goodman & Gilman – As bases farmacológicas da terapêutica**, Joel Hardman e Lee E. Limbird, 10 ed. , Rio de Janeiro, 2003.

HOGBEN, C.A.M.; KENT, T.H.; WOODWARD, P.A.; SILL, A.J. Quantitative histology of gastric mucosa: Man, dog, cat, guine pig, and frog. **Gastroenterology**, v. 67, p. 1143-1154, 1974.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. **Screening of some plants used in the brazilian medicine for treatment of infectious disease**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, p. 1027-1031, 2002.

HOU, W.; SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 22, p. 593–598, 2006.

HUBER, A. R.; WEISS, S. J. Disruption of the subendothelial basement membrane during neutrophil diapedesis in an in vitro construct of a blood vessel wall. **Clin. Invest.**, v. 83, n.4, p. 1122-1136, 1989.

JAIN, K.S.; SHAH, A.K.; BARIWAL, J.; SHELKE, S.M.; KALE, A.P.; JAGTAP, J.R.; BHOSALE, A.V. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.15, p. 1181-1205, 2007.

JAINU, M.; SRINIVASULU, C.; DEVI, S. Antiulcerogenic and ulcer healing effects of *Solanum nigrum* (L.) on experimental ulcer models: Possible mechanism for the inhibition of acid formation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 156–163, 2006.

JÁVOR, T.; TÁRNOK, F.; PAST, T.; NAGY, S. Cytoprotective effect of free radical scavengers against mucosal damage produced by different antirheumatic drugs. **Int J Tissue React.** v.8, n.1, p.35-40, 1986.

JIANG, Y.; WOOLLARD, A.C.S.; WOLFF, S.P. Lipid Hydroperoxide Measurement by Oxidation of Fe+2 in the Presence of Xilenol Orange. Comparison with the TBA Assay and an Iodometric Method. **Lipids.** v. 26, p. 853-856, 1991.

KAGAWA,S.; AOI,M.; KUBO, Y.; KOTANI, T.; TAKEUCHI,L. Stimulation by Capsaicin of duodenal HCO₃⁻ secretion via afferent neurons and vanilloid receptors in rats comparision with acid-induced HCO₃⁻ response. **Digestive Disease and Science**,v.48,p.1850-1856,2003.

Kallaya, E.; Suthiluk, P.; Naruemon, V.; Duangporn, T. Effects of Aloe vera and sucralfate on gastric microcirculatory changes, cytokine levels and gastric ulcer healing in rats. **World J Gastroenterol.**, v. 7, n.12, p. 2034-2039, 2006.

KAMIJI, M.M.; OLIVEIRA, R.B. Effect of vitamin C administration on gastric colonization by *Helicobacter pylori*. **Arq Gastroenterol.** v.42, n.3, p.167-72, 2005.

KARDOSOVA, A.; EBRINGEROVÁ, A.; ALFÔLDI, J.; NOSÁL'OVÁ, G.; FRANOVÁ, S.; HRIBALOVÁ, V. A biologically active fructan from the roots of *Arctium lappa* L., var. *Herkules*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 33, p. 135-140, 2003.

KAZUMORI, H.; ISHIHARA, S.; RUMI, M.A.K. Transforming growth factor-directly augements histidine decarboxylase and vesicular monoamine transporter 2 production in rat enteochromaffin-like cells. **Am. J. Gastrointest. Liver Physiol.** v.286, p. G508-G514, 2004.

KOBAYASHI, T.; OHTA, Y.; YOSHINO, J.; NAKAZAWA, S. Teprenone promotes the healing of acetic acid-induced chronic gastric ulcers in rats by inhibiting

neutrophil infiltration and lipid peroxidation in ulcerated gastric tissues. **Pharmacology Research**, v.43, p.23–30, 2001.

KOC, M.; IMIK, H.; ODABASOGLU, F. Gastroprotective and anti-oxidative properties of ascorbic acid on indomethacin-induced gastric injuries in rats. **Biol Trace Elem Res**. v.126, n.1-3, p.222-236, 2008.

KONTUREK, P.C.; KONTUREK, S.J.; BURNAT, G.; BRZOZOWSKI, T.; BRZOZOWSKA, I.; REITER, R.J. Dynamic physiological and molecular changes in gastric ulcer healing achieved by melatonin and its precursor L-tryptophan in rats. **Journal of Pineal Research**. , v. 45, p. 180-190, 2008.

KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S. J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. **Journal of Physiology and Pharmacology**. v.53, p.39-50, 2002.

KVIETYS, R. AND GRANGER, D. N. 1993. ***The vascular endothelium in gastrointestinal inflammation.*** In: *Immunopharmacology of the Gastrointestinal System* (Edited by Wallace J. L.), p. 69-94. Academic Press, New York.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. **Gastroenterology**, v.135, p.41–60, 2008.

LEONARD, S.S.; KEIL, D.; MEHLMAN, T.; PROPER, S.; SHI, X.; HARRIS, G.K. Essiac tea: scavenging of reactive oxygen species and effects on DNA damage. **J. Ethnopharmacol.**, v. 103, p. 288-296, 2006.

LIN, S.C.; CHUNG, T.C.; LIN,C.C.; UENG, T.H.; LIN, Y.H.; LINS.Y.; WANG, L.Y. Hepatoprotective effects of *Arctium lappa* on carbon tetrachloride- and acetaminophen-induced liver damage. **Am. J. Chin. Med.**, v. 28, p. 163-173, 2000.

LIN, S.C.; LIN,C.H.; LIN,C.C.; LIN, Y.H.; CHEN C.F.; CHEN, I.C.; WANG, L.Y. Hepatoprotective effects of *Arctium lappa* Linne on liver injuries induced by chronic ethanol consumption and potentiated by carbon tetrachloride. **J. Biomed Sci.**, v. 9, p.38-46, 2002.

LIPKING, M. In 'defense' of the gastric mucosa. **Gut.**, v.12, p.599-603, 1971.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. **Eur. J. Biochem.** v.47, p. 469-474, 1974.

MASINI, E.; CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; MARZOCCA, C.; MANNAIONI, P.F.; SALVEMINI, D. Protective effects of M40403, a selective superoxide dismutase mimetic, in myocardial ischemia and reperfusion injury in vivo. **Br.J.Pharmacol.**, v.136, p.905-917, 2002.

MCCORD, J.M.; GAO, B.; LEFF, J.; FLORES, S.C. Neutrophil-generated free radicals: possible mechanisms of injury in adult respiratory distress syndrome. *Environ.. **Health Perspect.*** v.102, n.10, p.57-60, 1994.

MEINING, A.; KIEL, G.; STOLTE, M. **Aliment Pharmacol Ther.** v.12, p.735-740, 1998.

MENDES, D. A. G. B; OTOFUJI, G. M.; MASUDA, E. T.; VELA, S. M.; MARQUES, M.C.A. **Efeito protetor gástrico do extrato bruto aquoso e etanólico das raízes de *Arctium lappa* L. (Bardana).** FESBE 2005, Resumos, p. 96, Águas de Lindóia, São Paulo, 2005.

MILANI, S.; CALABRÒ, A. Role of growth factors and their receptors in gastric healing. **Microscopy Research and Techniqye.** v.53, p.3060-371, 2001.

MILENOV, K.; TODOROV, S.; VASSILEVA M.; ZAMFIROVA R.; SHAHBAZIAN, A. Different effects of H₁ and H₂ blockers on the tone and the contractile activity of guinea pig stomach fundus. **Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.**, v.17, p.609-613, 1995.

MILIAUSKAS MORGAN, R. **Enciclopédia das ervas e plantas medicinais.** 8 ed. São Paulo: Hemus, 1997.

MÖSSNER, J.; CACA, K. Developments in the inhibition of gastric acid secretion. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 35, n.8, p.469-475, 2005.

MORITA, K. ; KADA, T. ; NAMIKI, M. A desmutagenic factor isolated from burdock (*Arctium lappa* Linne). **Mutat Res.**, v. 129, n.1, p. 25-31, 1984.

MOTILVA, V., MARTIN, M. J., LUQUE, M. I. and DE LA LASTRA, C. A. Role of Polymorphonuclear Leukocytes and Oxygen-Derived Free Radicals in Chronic Gastric Lesion Induced by Acetic Acid in Rat. **Gen. Pharmac.** v. 27, p.545-550, 1996

MULLER, M.J.; PRIOR, T.; HUNT, R.H.; RANGACHARI, P.K. Accelerated communication H₁ contractile and H₂ relaxant receptors in canine gastric muscularis mucosae **Life Sciences**, v.52, n.7, 1993.

OFMAN, J.J.; ETCHASON, J.; ALEXANDER, W.; STEVENS, B.R.; HERRIN, J.; CANGIALOSE, C.; BALLARD, D.J.; BRATZLER, D.; ELWARD, K.S.; FITZGERALD, D.; CULPEPPER-MORGAN, J.; MARSHALL, B. The Quality of Care for Medicare Patients With Peptic Ulcer Disease. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 95, n. 1, 2000.

OKABE, S., ROTH, L.A., PFEIER, J. A method of experimental penetrating gastric and duodenal, ulcers in rats. **Am J Dig Dis.**, v.16, p. 277–280, 1971.

OKABE, S.; AMAGASE, K. An Overview of Acetic Acid Ulcer Models —The History and State of the Art of Peptic Ulcer Research. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.28, n.8, 2005.

PEREIRA, J.V., BERGAMO, D.C.B., PEREIRA, J.O., FRANÇA, S.C., PIETRO, R., SOUSA, Y.T.C.S. Antimicrobial activity of *Arctium lappa* constituents against microorganisms commonly found in endontic infections. **Braz. Dent. J.**, v.16, p.192-196, 2005.

POECKEL, D.; GREINER, C.; VERHOFF, M.; RAU, O.; TAUSCH, L.; HOERNIG, C.; STEINHILBER D.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; WERZ, O. Carnosic acid and carnosol potently inhibit human 5-lipoxygenase and suppress pro-inflammatory responses of stimulated human polymorphonuclear leukocytes. **Biochemical pharmacology**. v.76, p. 91-97, 2008.

RODRIGUEZ, P.; BLANCO, J.; JUSTE, S. Allergic contact dermatitis due to burdock. **Contact Dermatitis** v. 33, p. 134–135, 1995.

SACHS, G.; SHIN, J.M.; MUNSON, K.; VAGIN, O.; CHO, Y.M.; YABUKOV, I. **Insights into control of gastric acid secretion from the structure and function of the gastric H,K-ATPase**. In: Modlin I. Gastrin to GERD. 1 Ed. Konstanz: Felsenstein CCCP. 2006. p. 414-36.

SASAKI, Y.; KIMURA, Y.; TSUNODA, T.; TAGAMI, H. Anaphylaxis due to burdock. **International Journal of Dermatology**, v. 42, p. 472–473, 2003.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 18, p. 639–649, 2002.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 20, p. 519–525, 2004.

SCHUBERT, M.L.; PEURA, D.A. Control of gastric acid secretion in health and disease. **Gastroenterology**, v.134, n.7, p.1842-1860, 2008

SEHIRLI Ö.; DEDE, E.T.; YÜKSEL, M.; ERZİK, C.; S. Ç. BERRAK; YEGEN Ç., SENER G. Antioxidant Effect of Alpha-Lipoic Acid against Ethanol-Induced Gastric Mucosal Erosion in Rats. **Pharmacology** v. 81, p.173-180, 2008.

SIRAKI,A.G.;POURAHMAD,J.; CHAN,T.S.;KHAN,S.; O'BRIEN,P.J. Endogenous and endobiotic induced reactive oxygen species formation by isolated hepatocytes. **Free Radical Biol. Med.**, v.32,p.2-10,2002.

SMITH, G.S.; MERCER D. W.; CROSS J. M.; BARRETO, J.C.; MILLER,A.T. Gastric injury induced by ethanol and ischemia-reperfusion in the rat. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 41, p. 1157-1164, 1996.

STOLTE,M.; MEINING,A.;SCHMITZ,J.M.;ALEXANDRIDIS,T.;SEIFERT,E. **Aliment Pharmacol. Ther.** , v.12,p.247-253, 1998.

SUZUKI, M.; SUZUKI, H.; KITAHORA, T.; MIYAZAWA , M.; NAGAHASHI, S.;SUZUKI, K.; ISHII, H. Treatment with a proton pump inhibitor promotes corpus gastritis in patients with Helicobacter pylori-infected antrum-predominant gastritis. **Aliment Pharmacol Ther.** v.16, p 159-165, 2002.

TAKAGI, E.; OKABE, S.; SAZIKI, R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and effect of several drugs on healing. **Japanese Journal of Pharmacology**. v. 19, p.416-426, 1969.

TAKEUCHI, K., FURUKAWA, O., NISHIWAKI, H. OKABE. S. 16,16-Dimethyl prostaglandin E2 aggravates gastric mucosal injury induced by histamine in rats. Possible role of the increased mucosal vascular permeability. **Gastroenterology**, v.93, p.1276-1286, 1987.

TARNAWSHI, A. Cellular and molecular mechanism of gastrointestinal ulcer healing. Dig. **Dis. Sci.**, v.50, s.1, p.24-33, 2005.

UEMURA, N.; OKAMOTO, S.; YAMAMOTO, S.; MATSUMURA, N.; YAMAGUCHI,A.; MASHIBA, H.; SASAKI, N.; TANIYAMA, K. **Aliment Pharmacol Ther.** v.14, p 1345-1352, 2002.

UKADA, K., TAKEUCHI, Y.,MOVAT, H. Z. Simple method for quantification of enhanced vascular permeability. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 133, p. 1384- 1413, 1970.

VLIETINCK , A.J. ; DE BRUYNE, T. ; APERS, S. ; PIETERS, L.A. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. **Planta Med.**, v. 64, n.2, p. 97-109, 1998.

VENKATARANGANNA, M.V.; GOPUMADHAVAN, S.; SUNDARAM, S.K.; MITRA. Evaluation of possible mechanism of anti-ulcerogenic activity of UL 409, a herbal preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.63, p. 187-192, 1998.

WALLACE, J. Mechanisms of Protection and Healing: Current Knowledge and Future Research. **Am J Med**, v.110, p. 19S–23S, 2001.

WALLACE, J.; DICAY, M.; MCKNIGHT, W.; MARTIN, G.R. Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats. **FASEB J.** v. 21, p. 4070–4076, 2007.

WANG, Q. ; WANG, Y.T. ; PU, S.P; ZHENG, Y.T. Zinc coupling potentiates anti-HIV-1 activity of baicalin. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.324, n.2, p. 605 – 610, 2004.

WANG, X.; LI, F.; SUN, Q.; YUAN, J.; JIANG, T.; ZHENG, C. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for separation and purification of arctiin from Fructus Arctii. **Journal of Chromatography A**, v. 1063, p. 247-251, 2005.

YAO, X.; FORTE, J.G. Cell biology of acid secretion by the parietal cell. **Annu. Rev. Physiol.** v. 65, p.103–31, 2003.

YASUI, K.; BABA, A. Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation. **Inflamm. res.**, v.55, p. 359–363, 2006.

YELKEN, B.; DORMAN, T.; ERKASAP, S.; DUNDAR, E.; TANRIVERDI, B. Clonidine pretreatment inhibits stress-induced gastric ulcer in rats. **Anesth Analg.** v.89, n.1, 159-162, 1999.

YUAN, Y.; PADOL, I.T.; HUNT, R.H. Peptic ulcer disease today. **Nature Clin Pract. Gastroent & Hepat.**, v. 3, n.2, 2006.

ZHAO, F., WANG, L., LIU, K. In vitro anti-inflammatory effects of arctigenin, a lignan from *Arctium lappa* L., through inhibition on iNOS pathway. **J Ethnopharmacol.**, v.21, p. 457-462, 2009.

